

# **Aufbau nanoskopischer Netzwerke aus DNA und Bindeproteinen**

Von der Fakultät Maschinenwesen  
der Technischen Universität Dresden

zur

Erlangung des akademischen Grades  
Doktoringenieur (Dr.-Ing.)  
angenommene

Dissertation

von

**Dipl.-Ing. Annegret Benke**  
aus Leipzig

**2007**

Tag der Einreichung: 24. April 2007

Tag der Verteidigung: 25. Oktober 2007

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. habil. W. Pompe  
Prof. Dr. rer. nat. habil. W. Hillen  
Prof. Dr. G. Cuniberti

## Inhalt

<b>1 Motivation und Einführung</b>	<b>1</b>
<b>2 DNA als Templat</b>	<b>6</b>
2.1 Struktureller Aufbau und mechanische Eigenschaften	6
2.2 Chemische Eigenschaften	12
2.3 Denaturierung und Reassoziaton	13
2.4 DNA-Protein-Bindungen	15
2.5 DNA-Technologie	18
2.5.1 Markieren mit interkalierenden Liganden	19
2.5.2 Schneiden mit Restriktionsendonukleasen	22
2.5.3 <i>Molecular Combing</i>	24
2.5.4 <i>Transfer Printing</i>	34
<b>3 Stempeln von DNA-Molekülen</b>	<b>37</b>
3.1 Experimentelles Vorgehen	38
3.2 Charakterisierung der Oberflächen	39
3.3 Beladen des Stempels durch <i>Molecular Combing</i>	41
3.3.1 DNA-Adsorption in Abhängigkeit vom pH-Wert	42
3.3.2 DNA-Adsorption in Abhängigkeit von der NaCl-Molarität im Puffer	44
3.3.3 <i>Molecular Combing</i> von Plasmid-DNA	46
3.3.4 Diskussion der Ergebnisse	47
3.4 Übertragung der DNA durch <i>Transfer Printing</i>	57
3.4.1 Nachweis des Transfers der Moleküle mit dem AFM	57
3.4.2 Experimente zur Untersuchung des Transfermechanismus	60
3.4.3 Transfermechanismus	62
3.5 Technische Anwendung: Stempeln in Kontaktstrukturen	64

<b>4 DNA-Verknüpfungen mittels Tet-Repressor-Protein</b>	<b>68</b>
4.1 Das Tet-System	68
4.2 Eingesetzte DNA-Template mit <i>tetO</i> -Sequenz und TetR-Proteine	71
4.3 Das Plasmid pUC19/AV16 - Besonderheiten bei der Elektrophorese	73
4.4 Anbindung des einfachen TetR-Proteins an die DNA	80
4.4.1 Nachweis im Gel	80
4.4.2 Abbildung mittels Rasterkraftmikroskopie	82
4.4.3 Bindung von TetR an $\lambda$ -DNA mit <i>tetO</i> und Analyse der Lage von <i>tetO</i> auf der DNA	85
4.5 Herstellung von DNA-Verknüpfungen mit dem modifizierten TetR-Protein	88
4.5.1 Strukturen aus kurzen DNA-Fragmenten	89
4.5.2 Verknüpfungen von Plasmiden	90
4.6 Diskussion und Ausblick hinsichtlich Netzwerkaufbau	93
 <b>Zusammenfassung</b>	 <b>96</b>
 <b>Literatur</b>	 <b>99</b>
 <b>Anhang</b>	 <b>106</b>
A Experimentelle Methoden	
B Eingesetzte Materialien und Geräte	

## Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AFM	Atomkraftmikroskop
bp	Basenpaar ( <b>b</b> ase <b>p</b> air)
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <b>d</b> esoxyribonucleic <b>a</b> cid)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
HTH	$\alpha$ -Helix-Turn- $\alpha$ -Helix
$\lambda$ -DNA	Lambda-Phagen-DNA
$\lambda$ - <i>tetO</i> -DNA	Lambda-Phagen-DNA mit <i>tet</i> -Operator
PAA	Polyacrylamid
PDMS	Polydimethylsiloxan
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
<i>tetO</i>	<i>tet</i> -Operator
TetR	Tet-Repressor
Tris	Trishydroxymethylaminomethan

## Einheiten

Å	Ångström
°C	Grad Celsius
Da	Dalton
g	Gramm
m	Meter
M	Molar
min	Minute
N	Newton
s	Sekunde
u	<i>unit</i>
V	Volt

## Vorsätze

m	milli ( $10^{-3}$ )
$\mu$	mikro ( $10^{-6}$ )
n	nano ( $10^{-9}$ )
p	piko ( $10^{-12}$ )

## Formelzeichen

$a$	Abstand zwischen zwei Basen
$A_M$	Mantelfläche
$c$	Konzentration an $\text{Na}^+$ -Ionen
$d$	Auflösungsvermögen des Mikroskopes
$D$	Durchmesser
$E$	Elastizitätsmodul ( <i>Young modulus</i> )
$F$	Kraft
$F_A$	Adsorptionskraft
$F_E$	entropische Kraft zur Aufrechterhaltung der Knäuelkonformation
$F_M$	Meniskuskraft
$K$	Biegesteifigkeit
$K_a$	Binde- oder Assoziationskonstante
$k_B$	<i>Boltzmann</i> -Konstante
$l$	Länge
$l_0$	Konturlänge der DNA
$m$	Masse
$M$	molare Masse
$n$	Anzahl an Basenpaaren
$N$	Teilchenzahl
$N_A$	<i>Avogadro</i> -Konstante
$NA$	Numerische Apertur
$P$	Persistenzlänge
$R$	Radius
$S$	elastischer Streckmodul
$s$	Weg
$T$	Temperatur
$T_m$	Schmelztemperatur der DNA
$W$	Arbeit
$W_E$	Energie
$X$	Anteil an Basenfehlpaarungen (Prozent)
$y$	Anzahl adsorbierter Moleküle
$z$	Stoffmenge
$\beta$	Proportionalitätsfaktor (Gleichung 3.6)
$\gamma$	Oberflächenenergie / Oberflächenspannung
$\varepsilon$	Proportionalitätsfaktor (Gleichung 3.5)
$\theta$	Winkel
$\lambda_L$	Lichtwellenlänge
$\tau_{\text{Adsorption}}$	Scherspannung

## 1 Motivation und Einführung

*"Im vergangenen halben Jahrhundert war DNA ausschließlich das Forschungsobjekt von Biologen und Biophysikern, sie haben die biologische Bedeutung und die molekularen Eigenschaften untersucht. In den nächsten 50 Jahren werden sie vermutlich von Materialwissenschaftlern, Nanotechnologen und Informatikern begleitet, die die chemischen Eigenschaften der DNA in einem nicht-biologischen Rahmen gebrauchen werden." (Nadrian C. Seeman, 2003 [SEE])*

Diese Arbeit ist eine biotechnologische, sie beschäftigt sich mit Untersuchungen zum Einsatz des Biomoleküls DNA für technische Anwendungen. Betrachtet man die Abmessungen eines DNA-Moleküls, ist es ebenso eine nanotechnologische Thematik. Die Bionanotechnologie ist ein interdisziplinäres Fachgebiet, hier arbeiten Materialwissenschaft, Molekularbiologie, Physik und Chemie eng zusammen. Am Beginn sollen deshalb einige Betrachtungen zur DNA, sowohl aus biologischer als auch aus nicht-biologischer Sicht, stehen.

Aus biologischer Perspektive gesehen, ist die DNA das Speichermedium der Erbinformation. Die Entdeckung des genetischen Codes und dessen Gültigkeit für alle Lebewesen begründete 1953 die moderne Molekularbiologie. In jenem Jahr entwarfen der Biologe *James D. Watson* und der Physiker *Francis H.C. Crick* das Modell der Doppelhelix als eine Art verdrehte Leiter, deren Sprossen aus komplementären Basen bestehen. Diese Komplementarität ist die herausragende Eigenschaft der DNA, die es ihr gestattet, sich selbst zu reproduzieren. Dabei wird sie längs gespalten und jede Hälfte dient als Schablone für die Ergänzung der fehlenden Hälfte. Diese Entdeckung der DNA-Struktur einschließlich ihrer Bedeutung für die Informationsübertragung in biologischen Systemen ist eine der wichtigsten wissenschaftlichen Erkenntnisse des 20. Jahrhunderts. Sie bildet das Fundament der heutigen Gentechnik, die in der Medizin zur Entwicklung von diagnostischen und therapeutischen Verfahren und von Arzneimitteln sowie in der Mikrobiologie, der Umweltschutztechnik, der Landwirtschaft und der Lebensmittelindustrie eine Rolle spielt.

Die Struktur des Makromoleküls macht die dichte Packung von DNA im Zellkern möglich. Humane Zellen enthalten z. B. eine Gesamtmenge an DNA von  $7,8 \cdot 10^9$  Basenpaaren,

entknäuelte entspricht das einer Länge von ungefähr 2 m [BLA]. Die "Verpackung" in 46 Chromosomen ist so effektiv, dass deren Gesamtlänge pro Zelle nur noch 200 µm beträgt. Durch solche besonderen Eigenschaften, wie hohe mechanische Stabilität bei gleichzeitiger großer Flexibilität sowie dem geringen Durchmesser von 2 nm bei großen möglichen Längen, ist das DNA-Molekül nicht nur in der biologischen und medizinischen Forschung von Interesse, sondern auch für andere Forschungsbereiche, wie die Nanotechnologie, attraktiv.

DNA ist ein ideales Material für die Konstruktion von Objekten im Nanometerbereich. Hierbei spielt die genetische Information keine Rolle. Maßgebend ist aber, dass man heute in der Lage ist, DNA synthetisch herzustellen. So können zielgerichtet bestimmte Sequenzen aufgebaut werden, die dann unter Nutzung der Komplementarität und der Fähigkeit zur Selbstassemblierung zu vorbestimmten Strukturen führen. Ein Beispiel hierfür ist die Konstruktion von dreiarmligen DNA-Kreuzungen [MER]. In einem zweistufigen Prozess wird zuerst das zentrale Element durch Hybridisierung von drei partiell komplementären Einzelsträngen hergestellt und anschließend werden die "Arme" verlängert, indem durch Ausnutzung von kurzen einsträngigen und komplementären DNA-Enden (*sticky ends*) lange DNA-Fragmente angesetzt werden. Neben solchen zweidimensionalen Strukturen können auch dreidimensionale aufgebaut werden. So beschreiben z. B. *Goodman et al.* [GOO] 2004 die Synthese eines Tetraeders mittels eines Ein-Schritt-Verfahrens, wobei sich die Autoren auf eine Arbeit von *Chen und Seeman* [CHE] beziehen, in der 1991 zum ersten Mal ein geschlossenes dreidimensionales Objekt, ein Würfel, aus DNA aufgebaut wurde.

Kompliziertere Konstruktionen aus DNA-Molekülen sind so genannte "Nanomaschinen", wie z. B. Schalter [VIA], Pinzetten [DIT 1] und Motoren [CEN, SEE]. So ist man z. B. in der Lage, die kontrolliert ablaufende Hybridisierung von DNA als Antrieb für einen molekularen Motor zu nutzen [TUR].

In der medizinischen Diagnostik, aber auch der Lebensmittel- und Umweltanalytik, werden Sensoren auf DNA-Basis zum Nachweis von Biomolekülen eingesetzt. Sie basieren ebenfalls auf der Zusammenlagerung von komplementären DNA-Strängen, wobei ein Bindungspartner als Erkennungsstruktur auf dem Signalwandler verankert und der komplementäre Bindungspartner das nachzuweisende Zielmolekül ist. In einer Publikation von *Drummond et al.* [DRU] wird ein Überblick über verschiedene Arten von DNA-Sensoren gegeben, so z. B. ein Sensor auf der Basis DNA-bindender Proteine beschrieben. Andere Sensoren reagieren auf Konformationsänderungen der DNA [FAN], detektieren spezifische Sequenzen von Oligonukleotiden oder auch winzige Mengen an umwelttoxischen Substanzen [MAS].

Bei diesen Anwendungen wird neben der Möglichkeit zur Miniaturisierung und der Nutzung der Selbstassemblierungsfähigkeit noch ein weiterer Vorzug von DNA für den Aufbau von Nanostrukturen deutlich: Die molekulare Erkennung. DNA kann andere Biomoleküle spezifisch binden oder auch als Templat für künstliche Nanopartikel, die z. B.



besondere optische oder elektronische Eigenschaften haben, dienen [MER]. Damit ist DNA auch für die Mikro- bzw. Nanoelektronik ein sehr interessantes Molekül, die Technik des *Biotemplating* wird in der *Bottom-up*-Technologie zum Aufbau von mikroelektronischen Strukturen verwendet. Im Unterschied zur *Top-Down*-Technologie der herkömmlichen lithographischen Strukturierungsmethoden bedeutet "*Bottom-up*" Strukturierung von unten nach oben, also Aufbau von Strukturen durch Selbstassemblierung und molekulare Erkennung der Bausteine. Dadurch ist eine deutliche Verkleinerung der aufzubauenden Strukturen möglich, so wie es durch die fortschreitende Miniaturisierung der mikroelektronischen Bauelemente von der Industrie in Zukunft gefordert werden wird. Diese Miniaturisierung könnte helfen, die Chipfertigung weiter zu verbilligen und die Signallaufzeiten auf einem Chip zu verkürzen [FÖR].

Die Integration von DNA-Molekülen in mikroelektronische Strukturen erfordert die Immobilisierung der DNA auf funktionalisierten Oberflächen, wie elektronischen Kontakten. Für eine einseitige Anbindung sind verschiedene Methoden bekannt, so z. B. die Ausnutzung elektrostatischer Wechselwirkungseffekte zwischen negativ geladenen DNA-Molekülen und einer mit positiven Ladungen funktionalisierten Oberfläche [JIN], die Herstellung einer kovalenten Bindung zwischen Schwefel und Gold bei der Anbindung einer mit Thiolgruppen modifizierten DNA auf einer Goldoberfläche [BRA] oder die Nutzung der spezifischen Bindung zwischen Biotin und Streptavidin nach einer Funktionalisierung von DNA-Enden und Oberfläche mit diesen Proteinen [ZIM]. Eine beidseitige Anbindung von DNA-Molekülen zwischen Kontakten kann aufgebaut werden, indem an diesen zwei verschiedene Oligonukleotide verankert werden und danach in einem zweiten Schritt die Brücke durch eine lange DNA mit zu den Oligonukleotiden komplementären Enden geschlossen wird [BRA]. Damit ein DNA-Molekül zwischen Kontakten gespannt werden kann, muss es von der Knäuelkonformation in eine lineare Form überführt werden. Die dazu notwendige Kraft wird z. B. durch einen hydrodynamischen Fluss in einer Flusszelle aufgebracht. Mit dieser Methode ist es auch möglich, einzelne  $\lambda$ -DNA-Moleküle durch Ausnutzung elektrostatischer Wechselwirkungen zwischen zwei Goldkontakten zu strecken [MER]. Dabei wird die DNA zuerst einseitig an einem Golddot angebunden und danach im Flüssigkeitsstrom so gestreckt, dass das andere Ende des Moleküls mit dem nächsten Golddot in Wechselwirkung treten kann. Auf diese Art und Weise können komplexe DNA-Netzwerke hergestellt werden. Durch Änderung der Richtung des Flüssigkeitsstromes kann die Ausrichtung der Moleküle variiert werden, sodass Kreuzungen und Netze entstehen können [MER].

Aufgrund der Molekülform bietet sich DNA für die Erzeugung von Nanodrähten an. Da bei nativen DNA-Molekülen Elektronentransport nur über kurze Distanzen möglich ist [LEW, GIE], die Moleküle bei Betrachtung größerer Dimensionen aber Isolatoreigenschaften haben, muss die elektrische Leitfähigkeit durch eine Metallisierung erhöht werden. Diese kann prinzipiell auf zwei verschiedenen Wegen erreicht werden, entweder durch Anlagerung von fertigen Metallclustern oder durch templatgesteuerte Keimbildung und Wachstum von Clustern entlang des Moleküls. So wurden z. B. Nanodrähte gefertigt,

die aus einer Kette von Platinclustern mit einer Clustergröße von 3-5 nm bestehen [MER]. DNA-Metallisierungen sind auch mit anderen Metallen möglich, so z. B. mit Silber [PET], Gold [NAK 3] Kupfer [MON] und Palladium [RIC 1]. Durch Anlagerung von Clustern aus halbleitenden Materialien, wie Kupfersulfid [DIT 2], entstehen Nanodrähte mit speziellen elektrischen Eigenschaften. Dabei können die Drähte sowohl in Lösung als auch auf einer Oberfläche immobilisiert erzeugt werden. Auch eine partielle, sequenzspezifische Metallisierung ist möglich [KER].

Alle diese beschriebenen Techniken zeigen, dass es für eine zukünftige Nanoelektronik schon viel versprechende Ansätze gibt. Die Grundlagenforschung auf dem Gebiet der Bionanotechnologie für die Mikro- und Nanoelektronik ist breit angelegt. Die heutige Mikroelektronik befindet sich schon dicht an der Grenze zur Nanoelektronik. Die kleinste mit Lithographie realisierte Strukturbreite liegt bei den Chips der neuesten Generation im industriellen Maßstab schon bei 70 nm [RIC 2] und sie wird noch weiter gesenkt werden können. Aber bei der Annäherung an prinzipielle Grenzen oder bei unverträglich hohen Kosten für den nächsten Entwicklungsschritt wird für die Nanoelektronik ein radikaler Technologiewechsel notwendig werden (BMBF-Förderkonzept Nanoelektronik 2006 [FÖR]).

Diese Herausforderung nimmt die vorliegende Arbeit an, indem sie sich der Untersuchung zweier grundlegender Methoden für den Aufbau von DNA-Strukturen für die Mikroelektronik widmet.

Die erste Methode ist das Stempeln von DNA-Molekülen (*Transfer Printing*). Es ist ein neues Verfahren zur zielgerichteten Immobilisierung von gestreckten Molekülen auf Oberflächen. Damit ist es möglich, DNA direkt in vorgegebene elektronische Kontaktstrukturen zu transferieren. Gegenüber allen bisher betrachteten Schritten zum kontrollierten Aufbau einer DNA-Nanostruktur hat das Verfahren einen großen Vorteil: Es ist mit vielen technologischen Schritten in der Mikroelektronik gut kombinierbar, weil es nicht an die Behandlung der DNA in flüssiger Phase gebunden ist. Das Design entsteht separat auf einem Stempel, erst danach werden die Moleküle auf das Substrat übertragen. Dadurch ist es mit der Methode des *Transfer Printing* möglich, gestreckte und überstreckte DNA-Moleküle auch auf solchen Oberflächen zu immobilisieren, auf denen eine Adsorption aufgrund von bestimmten Oberflächeneigenschaften (z. B. starke Hydrophilie) nicht möglich wäre.

Die zweite Methode für den kontrollierten Aufbau von DNA-Strukturen ist die Herstellung von DNA-Verknüpfungen mittels des DNA-bindenden Tet-Repressor-Proteins. Das aus den beiden Komponenten DNA mit *tet*-Operator-Sequenz und Tet-Repressor-Protein bestehende Tet-System ist aus der Genregulation bekannt und wird hier zum ersten Mal in einem technologischen Zusammenhang genutzt. Das Protein bindet sequenzspezifisch und mit hoher Bindekonstante an der 13 Basenpaare langen, palindromischen *tet*-Operator-Sequenz. Es kann als biologischer Schalter fungieren, denn durch kontrollierte Zugabe von

Tetrazyklin kann die DNA-Protein-Bindung wieder gelöst werden. In der vorliegenden Arbeit wird ein modifiziertes Tet-Repressor-Protein, das zwei DNA-Bindestellen besitzt, genutzt, um Nanostrukturen aus zwei definiert verknüpften DNA-Molekülen herzustellen. Diese Strukturen sind die Grundlage für in Zukunft darzustellende schaltbare DNA-Protein-Netzwerke.

Die Arbeit ist in drei Abschnitte unterteilt. Den beiden großen Komplexen "Stempeln von DNA-Molekülen" und "DNA-Verknüpfungen mittels Tet-Repressor-Protein" ist ein Kapitel vorangestellt, das DNA als Templat für den Aufbau von DNA-Netzwerken beschreibt. Hier geht es um grundsätzliche mechanische und chemische Eigenschaften und um besondere Funktionen des Moleküls, die bei der Verfolgung der Arbeitsziele wichtig sind (Denaturierung, Proteinbindung). Außerdem wird der gegenwärtige wissenschaftliche Stand bei den wesentlichen verwendeten technologischen Methoden, wie Markieren und Schneiden der Moleküle, *Molecular Combing* und *Transfer Printing* beschrieben.

Im nachfolgenden Kapitel werden die eigenen Arbeiten zum Stempeln von DNA dargestellt. Wie der Stempelprozess selbst wird auch dessen Beschreibung in die beiden Phasen "Beladung des Stempels" durch *Molecular Combing* und "Übertragung der DNA-Moleküle auf das Substrat" durch *Transfer Printing* eingeteilt. Mit dem Ziel der Erforschung des Transfermechanismus werden experimentelle Untersuchungen zum Adsorptionsverhalten von DNA in Abhängigkeit verschiedener Parameter (z. B. Oberflächeneigenschaften, pH-Wert und Salzkonzentration des Puffers, Luftfeuchte) vorgestellt. Am Ende dieses Komplexes werden Ansätze für erste technische Anwendungen gezeigt.

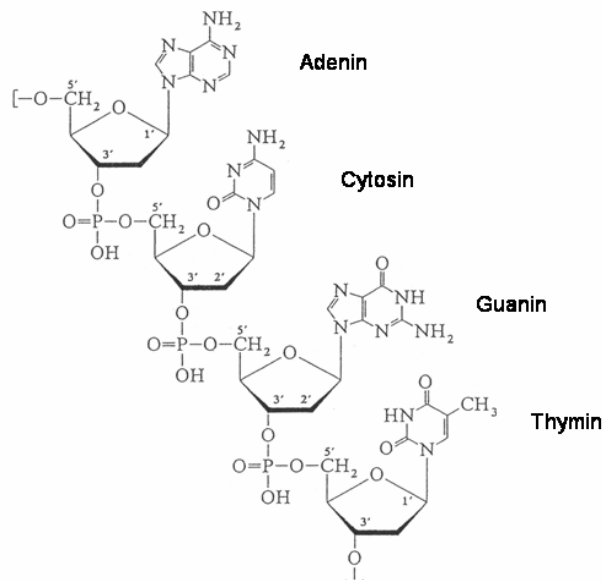
Im Kapitel "DNA-Verknüpfungen mittels Tet-Repressor-Protein" wird, ausgehend von der Beschreibung des Tet-Systems, der Netzwerkaufbau über DNA-Protein-Bindungen verfolgt. Dabei bildet die Darstellung der Methoden für Nachweis und Abbildung der Bindung die Grundlage für den nachfolgenden Aufbau von komplexeren Strukturen mit Hilfe des modifizierten Tet-Repressor-Proteins.

Im Anhang befinden sich eine Zusammenfassung der eingesetzten Materialien und Geräte sowie die Beschreibung von experimentellen Methoden.

## 2 DNA als Templat

### 2.1 Struktureller Aufbau und mechanische Eigenschaften

Als Primärstruktur eines DNA-Stranges bezeichnet man die unverzweigte, kettenförmige Gestalt des Makromoleküls. Es besteht aus Monomer-Einheiten, den Nukleotiden, die durch kovalente Bindungen miteinander verknüpft sind. Jedes Nukleotid ist aus einem Basenteil (Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G), Thymin (T)), einem Zuckeranteil (Desoxyribose) und einem Phosphatrest zusammengesetzt. Wie in Abbildung 2.1 zu sehen ist, befinden sich an den 1'-Positionen der Ribosereste je eine der Purin- (A; G) oder Pyrimidinbasen (T; C). Die Verknüpfung der Nukleotide untereinander erfolgt über Phosphatbrücken (Phosphodiesterbindungen) zwischen dem C<sub>5'</sub>-Atom eines und dem C<sub>3'</sub>-Atom des nächsten Nukleotids [KNI].



**Abb. 2.1:** Primärstruktur eines DNA-Einzelstranges, bestehend aus dem Zucker-Phosphat-Rückgrat und den vier Basen Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin.

In wässriger Lösung besteht ein DNA-Molekül aus zwei solcher Einzelstränge, die sich als Doppelhelix zusammenlagern (Abbildung 2.2). Der Durchmesser einer DNA-Doppelhelix beträgt ca. 2 nm, die Länge eines DNA-Moleküls kann zwischen einigen Basenpaaren und mehreren 100 Kilo-Basenpaaren variieren. Das Prinzip der Helixbildung ist das

bedeutendste übergeordnete Strukturprinzip für eine Sekundärstruktur bei Biopolymeren. Typische Helixstrukturen neben der DNA-Doppelhelix sind die Amylose-Helix und die  $\alpha$ -Helix der Proteine [ACK]. Aus den Windungen der Helix resultiert die große Flexibilität eines DNA-Moleküls. Ursache ist die Beweglichkeit der chemischen Bindungen im Fünfering der Desoxyribose, zwischen der Ribose und den Phosphatresten und zwischen Ribose und Base. Die Purin- und Pyrimidinringe können sich wie starre Scheiben um diese glycosidische Bindung drehen [KNI].



**Abb. 2.2:** Modell und Dimensionen der DNA-Doppelhelix (B-Form) nach [KNI]. Eine vollständige Windung verläuft über 3,4 nm und enthält ca. 10 Basenpaare. Die beiden Stränge verlaufen antiparallel, ihre 5'  $\rightarrow$  3'-Richtungen sind gegenläufig.

Beide Einzelstränge sind durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen miteinander verbunden. Dabei sind nur die so genannten Watson-Crick-Basenpaarungen erlaubt, d. h., A-T- und G-C-Paarungen (komplementäre Basen). Je ein Purinring bildet mit einem Pyrimidinring ein Basenpaar. Nur so ist der Aufbau der Helix möglich, denn zwischen Adenin und Thymin werden zwei, zwischen Guanin und Cytosin werden drei Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet. Die Komplementarität der Basen ist ein wichtiges Merkmal der DNA.

Der größte Teil der DNA in lebenden Zellen existiert in der so genannten B-Form, d. h., es treten die folgenden typischen Strukturmerkmale auf: Es gibt 10,4 bis 10,5 Basenpaare pro Helixwindung, der Abstand zwischen zwei Basenpaaren beträgt ca. 0,34 nm und der Winkel zwischen der Helixachse und den Basen ca.  $90^\circ$ . Bei einer Abnahme des Wassergehaltes kommt es zu einer Änderung der DNA-Struktur, die B-Form geht in die so genannte A-Form über. Der Abstand zwischen zwei Basenpaaren wird geringer (ca. 0,26 nm) und die Basenpaare stehen nicht mehr rechtwinklig zur Helixachse, sondern in einem Winkel von  $71^\circ$  bis  $77^\circ$ . Der Übergang ist reversibel [KNI 1].

Die mechanischen Eigenschaften der DNA wie Reißfestigkeit, Elastizität und der Zusammenhalt der Doppelstränge werden durch das Zusammenwirken der verschiedenen intramolekularen Bindungsarten bestimmt. Die stärksten Bindungen im Molekül sind die kovalenten Bindungen zwischen Ribose und Phosphatrest. Sie bestimmen die mechanische Zerreißgrenze. Die nächstschwächeren Bindungen sind die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Basen. Sie tragen ebenfalls erheblich zur Stabilität der Doppelhelix bei. Außerdem gibt es Wechselwirkungen zwischen den aufeinander gestapelten Basen, die ebenso einen Beitrag zur mechanischen Stabilität der DNA-Moleküle liefern. Das sind zum einen hydrophobe Wechselwirkungen und zum anderen das so genannte "base stacking". Dieses Übereinanderstapeln der Basen führt zum Überlappen der  $\pi$ -Elektronenorbitale. Das "base stacking" und die spezielle Bauweise verleihen der DNA eine hohe Steifigkeit. Um beispielsweise einen Doppelstrang zu einem Kreis zusammenzubiegen, wird fünfzigmal mehr Energie benötigt als zum Zusammenbiegen eines Einzelstranges [BUS 1].

In Lösung besitzt ein lineares Makromolekül aus Entropiegründen die Gestalt eines statistischen Knäuels. Das elastische Verhalten solcher Knäuelmoleküle kann mit Hilfe verschiedener Modelle beschrieben werden [WEN], z. B. mit dem *Freely-jointed-chain* (FJC)-Modell, das die DNA als eine Kette aus unkoordinierten Segmenten betrachtet. Für relativ steife Biopolymere wie DNA ist das *Worm-like-chain* (WLC)-Modell geeignet, welches die DNA als einen einheitlichen elastischen Stab behandelt und durch einen einzigen Parameter, die Persistenzlänge, charakterisiert [BUS 1]. Das Modell der Persistenzkette von *Porod* und *Kratky* [KRA] stellt den Übergang vom flexiblen Knäuel zum steifen, stabförmigen Molekül dar. Dabei geht es von der Überlegung aus, dass jeder Bindungswinkel eine Nachwirkung auf die Lage der folgenden Kettenglieder hat. Diese Nachwirkung wird quantitativ durch die Persistenzlänge  $P$  ausgedrückt. Für doppelsträngige DNA beträgt der Wert für  $P$  unter physiologischen Bedingungen ca. 50 nm [BAU, BUS 1]. Die Persistenzlänge ist ein Maß für die Biegesteifigkeit  $K$  eines Moleküls, es gilt folgende Beziehung ( $k_B$ : Boltzmann-Konstante,  $T$ : Temperatur):

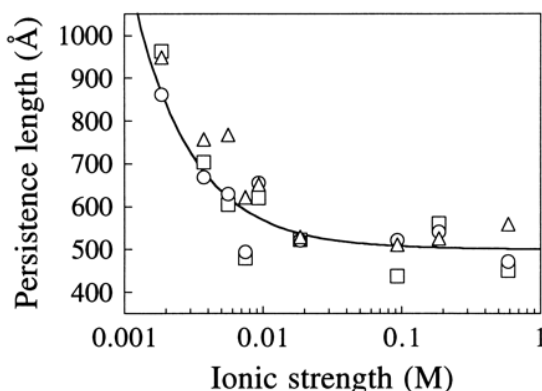
$$K = k_B \cdot T \cdot P \quad (2.1)$$

Eine kleinere Biegesteifigkeit bedingt die Ausbildung eines kompakteren Knäuels. Die Energie  $W_E$ , die notwendig ist, um ein DNA-Kettenglied der Länge  $l$  um einen Winkel  $\theta$  bzw. einen Kurvenradius  $R$  zu biegen, kann wie folgt berechnet werden:

$$W_E(\theta) = \frac{k_B \cdot T \cdot P \cdot l}{2 \cdot R^2} = \frac{k_B \cdot T \cdot P}{2 \cdot l} \theta^2 \quad (2.2)$$

Dieses Modell zeigt, dass eine sanfte Krümmung des Moleküls mit einer über eine große Distanz verteilten Beanspruchung energetisch günstiger ist als eine scharfe Krümmung [BUS 1]. Bei der Anbindung von Bindeproteinen an die DNA (siehe Kapitel 2.4) spielt diese mechanische Eigenschaft eine Rolle, hier kann es während der Bindung zu einer starken Biegung des DNA-Moleküls kommen.

Es gibt einen Parameter, der auf die Größe der Persistenzlänge von DNA starken Einfluss hat: Die Ionenstärke der umgebenden Lösung. Da die Phosphatrücken beider Einzelstränge negativ geladen sind, stoßen sie sich voneinander ab und versteifen damit das Molekül. Befinden sich aber Kationen in der Lösung, werden die negativen Ladungen abgeschirmt und das Gesamtmolekül wird flexibler. Die Persistenzlänge nimmt mit steigender Ionenstärke der Pufferlösung ab [WER, BAU]. Dieser Sachverhalt ist für einwertige Ionen ( $\text{Na}^+$ ) in Abbildung 2.3 dargestellt. Der Einfluss von mehrwertigen Ionen (z. B.  $\text{Mg}^{2+}$ ) auf die Persistenzlänge wurde von *Baumann et al.* ebenfalls untersucht, es ergibt sich derselbe Kurvenverlauf, aber die Persistenzlängen werden mit 25 bis 30 nm noch kleiner als im so genannten "völlig neutralisierten" Zustand.



**Abb. 2.3:** Abhängigkeit der Persistenzlänge von der  $\text{Na}^+$ -Ionen-Stärke [BAU]. Die Symbole stehen für Datenfits nach verschiedenen WLC-Regimes.

Die Persistenzlänge ist außerdem eine Funktion der Basensequenz. G-C-reiche Regionen sind aufgrund der größeren Anzahl an Wasserstoffbrücken steifer als A-T-reiche Regionen der DNA [MAR].

Zur direkten Messung von mechanischen Eigenschaften von Einzelmolekülen können Kraft-Dehnungs-Messungen durchgeführt werden. Typische Kraft-Verlängerungs-Messdaten eines  $\lambda$ -DNA-Moleküls mit einer Konturlänge von ca.  $16 \mu\text{m}$  zeigt Abbildung 2.4. Für kleine Dehnungen bis ca. 95% der Konturlänge sind aufgrund der entropischen Elastizität des Moleküls nur geringe Kräfte bis 5 pN nötig [SMI, SAM]. Als Konturlänge bezeichnet man die Länge eines Moleküls im ausgestreckten, aber nicht überstreckten Zustand. Wenn die Konturlänge erreicht ist, steigt die Kraft stark an. Das DNA-Molekül verbleibt in der B-Form. Das elastische Verhalten weicht aber von der Theorie der Unausdehnbarkeit (*inextensible*-WLC-Modell) ab.



Bei einer Kraft von ca. 65 pN beginnt eine drastische Umwandlung im DNA-Molekül, es kommt zur Überstreckung auf 170% (200% [MAR]) der Konturlänge bei nur ganz geringer Kraftänderung (*overstretching transition*). Der nachfolgende nochmalige Kraftanstieg zeigt den vollständigen Übergang des Moleküls in die überstreckte Form an. Auch das überstreckte Molekül verhält sich elastisch, die starken Verformungen sind reversibel. Die Struktur der überstreckten DNA ist noch nicht vollständig aufgeklärt, aber es werden molekulare Modelle vorgeschlagen, in denen DNA zu einer leiterartigen Struktur entwunden oder zu einem Strang mit reduziertem Radius geformt wird [WIL]. Während der Relaxationsphase werden, besonders bei geringem Salzgehalt, Hysteresen beobachtet, für deren Erklärung in der Literatur verschiedene Modelle diskutiert werden. Ein möglicher Hysteresemechanismus beruht auf dem Bruch von Einzelsträngen innerhalb der Moleküle, die zum teilweisen Aufschmelzen der DNA führen. Diese einsträngigen Bereiche können nun innerhalb des Belastungs-/Entlastungs-Zykluses zu geringeren Kräften während der Relaxation im überstreckten Bereich führen [SMI].

Mit Hilfe von Dehnungsexperimenten wurde der Elastizitätsmodul (*Young modulus*) von DNA bestimmt und z. B. mit  $E = 1,1 \times 10^8 \text{ Nm}^{-2}$  [HOG] und  $E = 3,46 \times 10^8 \text{ Nm}^{-2}$  [SMI] angegeben. Die Werte sind von den angenommenen DNA-Abmessungen und natürlich vom Dehnungs-/Überdehnungszustand des Moleküls (siehe Kurvenverlauf) abhängig. Nur für elastisches Verhalten im Bereich der Hookschen Geraden kann über die Beziehung

$$F = E \cdot A \cdot \left( \frac{l}{l_0} - 1 \right) \quad (2.3)$$

$$l = l_0 \left( \frac{F}{E \cdot A} \right) + 1$$

die Länge des gedehnten Moleküls  $l$  bei einer Kraft  $F$  ermittelt werden ( $A$  - Querschnittsfläche,  $l_0$  - Konturlänge [BEN 2]).

Wie in Abbildung 2.4 zu sehen ist, kann die Dehnung eines DNA-Moleküls mit dem WLC-Modell auch nur in einem begrenzten Längenbereich beschrieben werden. *Baumann et al.* [BAU] schildern für das WLC-Modell zwei verschiedene elastische Regimes.

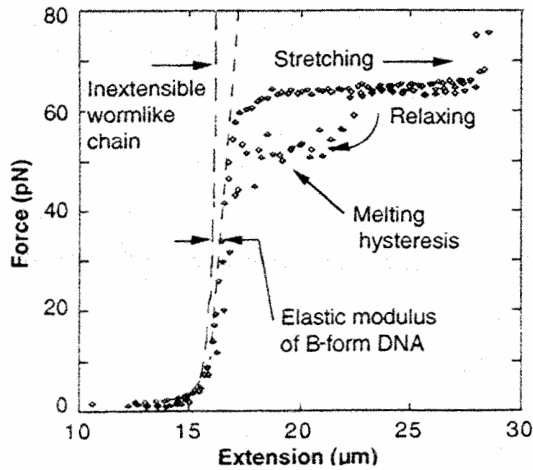
Das eine Regime beruht auf der Abnahme der Entropie im gestreckten Zustand. Es geht von der Unausdehnbarkeit von DNA-Molekülen aus (*inextensible* WLC-Regime), d. h., es gilt nur im Bereich von  $l < l_0$ :

$$\frac{F \cdot P}{k_B \cdot T} = \frac{1}{4} \left( 1 - \frac{l}{l_0} \right)^{-2} - \frac{1}{4} + \frac{l}{l_0} \quad (2.4)$$

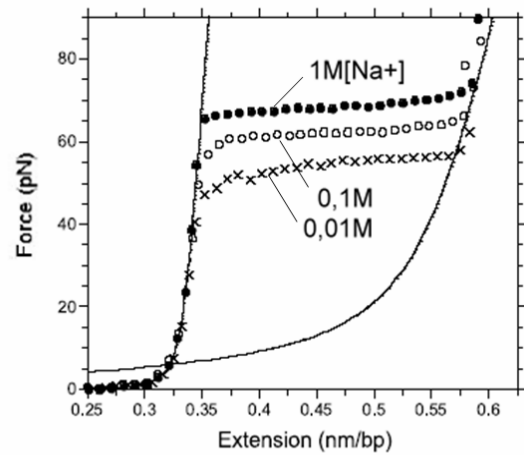


Das zweite Regime lässt elastische Dehnungen der DNA auch über die Konturlänge  $l_0$  hinaus zu (*extensible* WLC-Regime), indem ein elastischer Streckmodul  $S$  eingeführt wird:

$$\frac{l}{l_0} = 1 - \frac{1}{2} \sqrt{\frac{k_B \cdot T}{F \cdot P}} + \frac{F}{S} \quad (2.5)$$



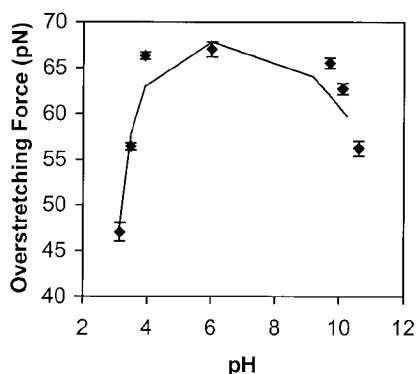
**Abb. 2.4:** Kraft-Verlängerungs-Kurve für  $\lambda$ -DNA in 50 mM NaCl, 10 mM TE-Puffer, pH 8 [SMI].



**Abb. 2.5:** Einfluss der Molarität von  $\text{Na}^+$ -Ionen im Puffer (pH 7) auf die Kraft-Verlängerungs-Kurve von doppelsträngiger DNA [WER], durchgezogene Linien repräsentieren *extensible* WLC-Modell (links) und JFC-Modell (rechts).

Die Größe der Kraft, bei der der Bereich des Überstreckens von DNA-Molekülen beginnt, ist vom Salzgehalt der Lösung abhängig. Abbildung 2.5 zeigt das typische Absinken dieser Kraft bei Abnahme der Ionenstärke an  $\text{Na}^+$ -Ionen. Während hohe Salzkonzentrationen die DNA stabilisieren und die Aufschmelztemperatur erhöhen (siehe Kapitel 2.3), kommt es bei niedrigerem Salzgehalt eher zu kraftinduziertem Aufschmelzen, wobei die Moleküle oder Einzelstränge brechen können [WER].

Ein von *Rouzina* und *Bloomfield* entwickeltes theoretisches Modell zum Aufschmelzen während der Überstreckungsphase sagt voraus, dass die Kraft, die zum Überstrecken der Moleküle notwendig ist, kleiner wird, sobald die Helix destabilisiert ist [ROU 1, 2]. Folglich wurde auch der Einfluss des pH-Wertes auf die Phase des Überstreckens untersucht und festgestellt, dass beide Extreme des hohen und niedrigen pH-Wertes zum Absinken der zum Überstrecken nötigen Kraft führen. Abbildung 2.6 demonstriert die Änderungen der Überstreckungskraft in Abhängigkeit vom pH-Wert. Ausgehend von 67 pN bei pH 6 sinkt die Kraft im sauren Bereich bis auf 47 pN bei pH 3,1 und im basischen Bereich bis auf 56 pN bei pH 10,6 [WIL].



**Abb. 2.6:** Überstreckungskraft als Funktion des pH-Wertes [WIL]. Die Erniedrigung des Schmelzpunktes von Doppelstrang-DNA durch Veränderung des pH-Wertes führt zu kleineren Überstreckungskräften.

An DNA gebundene Liganden, wie z. B. der Fluoreszenzmarker YOYO-1, verändern die mechanischen Eigenschaften der DNA-Moleküle ebenfalls [SIS]. So haben die Liganden starken Einfluss auf die Persistenzlänge und die Konturlänge. Kraft-Ausdehnungs-Kurven weichen vom typischen, in Abbildung 2.4 dargestellten, Verlauf ab. In Kapitel 2.5.1 wird der Einfluss interkalierender Liganden auf die DNA behandelt.

## 2.2 Chemische Eigenschaften

Für das Verständnis der in der Arbeit vorgenommenen pH-Wert-abhängigen Experimente mit DNA-Molekülen ist es sinnvoll, neben den mechanischen Eigenschaften auch das chemische Verhalten von DNA zu betrachten.

DNA-Moleküle sind in wässriger Lösung und bei neutralem pH-Wert negativ geladen, d. h., sie sind Polyanionen. Jede Phosphatgruppe im Rückgrat besitzt eine negative Ladung. Nur im extrem sauren pH-Bereich  $< 1$  werden die Phosphatgruppen protoniert. Ab einem pH-Wert von 6,8 wird in Richtung des alkalischen Bereichs ein zweites Proton abgespalten [BLA]. Kationen können sich an die Phosphatreste anlagern und so die Abstoßungskräfte zwischen den beiden negativ geladenen Einzelsträngen beeinflussen. An den offenen Enden der Einzelstränge entsteht aufgrund der fehlenden Bindung zum nächstfolgenden Nukleotid an den Phosphatgruppen jeweils ein zweites nicht abgesättigtes Sauerstoffion, sodass sich für die DNA-Enden eine geringfügig stärkere negative Ladung ergibt.

Der Säure-Base-Charakter der Nukleotide ist ein wichtiges Merkmal derselben. Er bestimmt die Ladung, die tautomerische Struktur (verschiedene Positionierung von Wasserstoffatomen und Doppelbindungen im Molekül, z. B. bei der Bildung von Keto- oder Enol-Strukturen der Basen) und die Fähigkeit, Wasserstoffbrückenbindungen einzugehen [BLA]. Im physiologischen Bereich zwischen pH 5 und pH 9 sind die Basen ungeladen. Bei pH-Werten außerhalb dieses Bereiches führt eine Protonierung oder

Deprotonierung zur Auflösung einer Wasserstoffbrückenbindung und damit zur Destabilisierung des Doppelstranges. Entsprechend der  $pK_s$ -Werte der Basen (negative dekadische Logarithmen der Säurekonstanten) werden an Adenin und Cytosin bei einer Änderung des pH-Wertes auf 3,9 bzw. 4,6 einzelne Stickstoffatome protoniert, Guanin (1'-Stickstoff) und Thymin geben bei pH-Werten  $> 10,0$  Protonen ab.

Im stark sauren Milieu und bei hohen Temperaturen treten außerdem Protonierungen auf, die zur Aufspaltung der glycosidischen Bindungen zwischen den Purinbasen und den Zuckerresten führen (Apurin-Stellen) [KNI 1]. In diesen Fällen bleibt zwar das Phosphatrückgrat erhalten, der Doppelstrang ist aber durch die fehlende Base permanent getrennt.

Für alle Biomoleküle ist es notwendig, mit dem lebenswichtigen Medium Wasser in Wechselwirkung zu treten. Nukleinsäuren sind aufgrund des polyionischen Charakters in Wasser löslich. Die Außenseite der DNA, d. h., das Phosphatrückgrat verhält sich hydrophil, der Kern dagegen mit den innen liegenden Basen ist hydrophob. Diese Eigenschaft der DNA ist für das Adsorptionsverhalten von DNA-Molekülen auf Oberflächen von großer Bedeutung.

## 2.3 Denaturierung und Reassoziaton

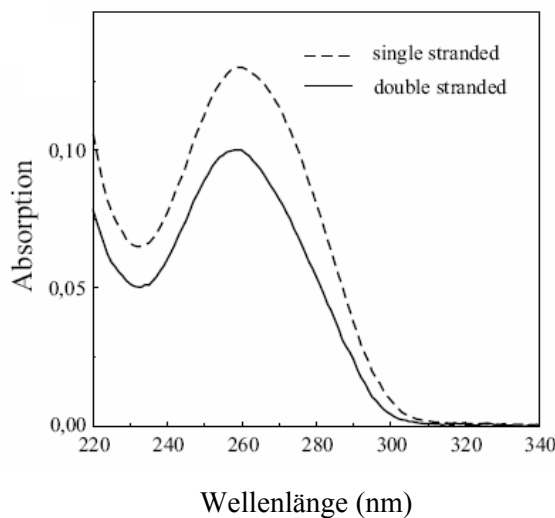
Trennen sich die beiden Stränge der Doppelhelix, spricht man von Denaturierung oder vom "Aufschmelzen" einer DNA. Die Moleküle können vollständig oder auch teilweise denaturiert sein. Der teilweise denaturierte Zustand, bei dem der hydrophobe Kern der DNA zugänglich wird, spielt bei der Adsorption von DNA-Molekülen auf Oberflächen eine wichtige Rolle (siehe Kapitel 2.5.3).

Eine vollständige Denaturierung kann durch Erhitzen herbeigeführt werden. Dabei werden die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Basen gelöst, während die kovalenten Phosphodiesterbindungen im Rückgrat des Moleküls intakt bleiben. Der Prozess ist reversibel. Beim Abkühlen der DNA-Lösung reassoziieren komplementäre Stränge wieder und bilden wieder die Helixstruktur aus (Hybridisierung).

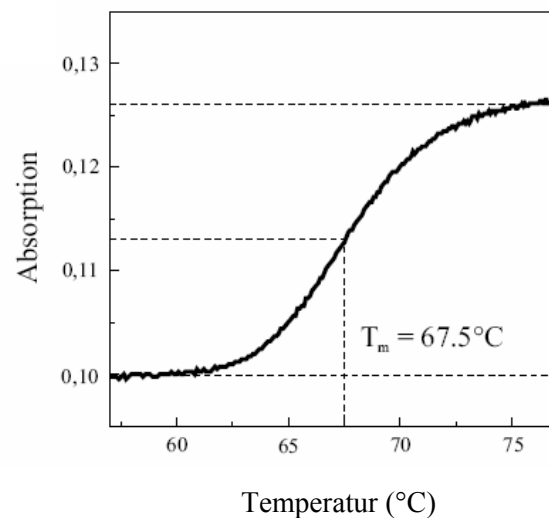
Denaturierende Konformationsumwandlungen können außer durch Temperaturerhöhung auch durch pH-Wert-Änderung, durch Verringerung der Ionenstärke oder Änderung der Ionenart der Gegenionen der Phosphatgruppen oder durch Zusatz bestimmter organischer Lösungsmittel, wie z.B. Alkohole, induziert werden [ACK].

Der Grad der Denaturierung von DNA-Molekülen kann durch Messung der Absorption von UV-Licht (UV-Spektroskopie) bestimmt werden. Dabei wird ausgenutzt, dass

doppelsträngige DNA in Helixkonformation ein anderes Absorptionsspektrum aufweist als DNA-Einzelstränge. Die Absorption beruht auf der elektronischen Anregung der aromatischen Ringsysteme der DNA-Basen. Das Absorptionsmaximum liegt konformationsunabhängig bei einer Wellenlänge von 260 nm. Der Extinktionskoeffizient doppelsträngiger DNA ist aber niedriger als der von einsträngiger DNA, weil in der geordneten Doppelhelixstruktur das  $\pi$ -Elektronensystem durch Wechselwirkungen der  $\pi$ -Elektronen übereinander gestapelter Basen so verändert ist, dass die Übergangswahrscheinlichkeit der  $\pi$ -Elektronen in den angeregten Zustand vermindert wird. Diesen Effekt bezeichnet man als Hyperchromizität. Abbildung 2.7 zeigt beispielhaft je ein Absorptionsspektrum für einzel- und doppelsträngige DNA. Bestimmt man Absorptionwerte bei einer Wellenlänge von 260 nm für verschiedene Temperaturen, erhält man die Schmelzkurve (Abbildung 2.8). Die Schmelztemperatur  $T_m$  ist als die Temperatur definiert, bei der die Hälfte der Gesamtänderung der Absorption erzielt wird.



**Abb. 2.7:** Absorptionsspektren für Einzel- und Doppelstrang-DNA (Konzentration: 5  $\mu\text{g/ml}$ ) nach [SEI].



**Abb. 2.8:** Schmelzkurve von Lachsspermien-DNA (Konzentration: 5  $\mu\text{g/ml}$ ) in 10 mM  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ -Lösung. Die Schmelztemperatur  $T_m$  wurde der Kurve entnommen [SEI].

Schmelzkurve und damit Schmelztemperatur sind charakteristisch für jede DNA, weil das Schmelzverhalten eine direkte Folge des GC-Basenpaar-Anteiles ist. Zur Auftrennung von GC-Basenpaaren ist ein höherer Energieeintrag notwendig als zur Trennung von AT-Basenpaaren, da GC-Basenpaare eine Wasserstoffbrückenbindung mehr besitzen. Ein weiterer Parameter, der das Schmelzverhalten beeinflusst, ist die Salzkonzentration der Lösung. Eine Erhöhung der Salzkonzentration führt zu einem Ansteigen der Schmelztemperatur. Wie in Kapitel 2.1 beschrieben, kommt es in diesem Fall zur Ladungsabschirmung des negativ geladenen DNA-Rückgrates. Die Abstoßungskräfte

zwischen den Einzelsträngen werden vermindert, d. h., beide Stränge werden durch die Wasserstoffbrückenbindungen stabil zusammengehalten.

Für DNA-Moleküle mit einer Länge von maximal 100 Basenpaaren und einer Natriumionenkonzentration im Medium, die 0,5 M nicht überschreitet, kann die Schmelztemperatur mit Hilfe der folgenden, von *Baldino et al.* [BAL] aufgestellten Größengleichung bestimmt werden, wobei mit  $c$  die Konzentration an einwertigen Kationen, mit  $GC$  der Anteil an GC-Basenpaaren in Prozent, mit  $n$  die DNA-Länge in Basenpaaren und mit  $X$  der Anteil an Basenfehlpaarungen in Prozent bezeichnet ist:

$$T_m [^{\circ}\text{C}] = 81,5 + 16,6 \cdot \lg c + 0,41 \cdot GC - \frac{675}{n} - 1 \cdot X \quad (2.6)$$

*Williams et al.* [WIL] beschreiben eine Abhängigkeit der Lage von Schmelzkurven für  $\lambda$ -DNA vom pH-Wert in einem Bereich von 3,1 bis 10,2. Dabei kommt es, ausgehend von der maximalen Schmelztemperatur bei pH 6, zu einer starken Verringerung der Schmelztemperaturen im sauren und basischen Bereich.

Die Geschwindigkeit der Reassoziaton hängt ebenfalls von den Parametern Salzkonzentration, Temperatur (die optimale Temperatur liegt etwa 25 °C unter  $T_m$  [KNI 1]) und Größe und Konzentration der DNA ab. Die Kinetik lässt sich als ein zweistufiger Prozess beschreiben. Der erste Schritt umfasst das erste Zusammentreffen komplementärer Nukleotidfolgen und die Ausbildung der ersten passenden Basenpaarungen (Nukleation). Im zweiten Schritt kommt es zu schnellen Ausbildungen von Basenpaarungen in den anschließenden Teilen der DNA-Stränge. Der zeitbestimmende Schritt bei der Reassoziaton ist das erste Zusammentreffen der komplementären Basenfolgen [KNI 1]. Daraus ist ersichtlich, dass teilweise denaturierte Moleküle schnell wieder hybridisieren können.

An theoretischen Modellen zur Beschreibung des Schmelzverhaltens von DNA wird seit Beginn der 60er Jahre des 20. Jahrhunderts gearbeitet, einen Überblick dazu geben z. B. *Kafri et al.* [KAF].

## 2.4 DNA-Protein-Bindungen

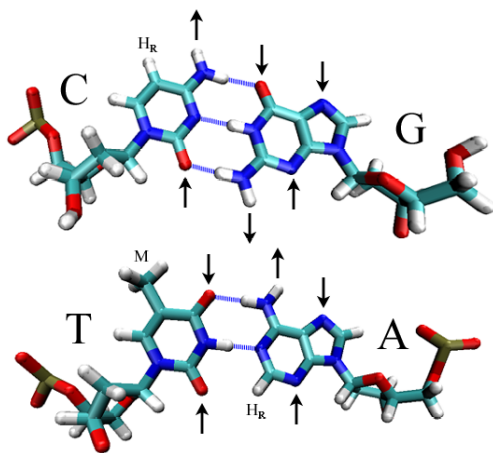
In der Natur spielen Interaktionen zwischen Proteinen und DNA in allen Bereichen der Genregulation eine entscheidende Rolle. Von besonderer Bedeutung sind dabei die sequenzspezifische DNA-Erkennung und DNA-Bindung durch Proteine. Bei den im

Rahmen dieser Arbeit erzeugten DNA-Verknüpfungen über Proteine wird diese Eigenschaft der Sequenzspezifität des eingesetzten Tet-Repressor-Proteins ausgenutzt.

Die Spezifität der Bindung erfolgt auf atomarer Ebene durch Interaktionen bestimmter Seitenketten der Proteine mit den Nukleotiden der DNA. Sequenzspezifisch bindende Proteine erkennen die Basen in der DNA durch chemische Wechselwirkung mit den freien funktionellen Gruppen. Bis heute existieren aber keine allgemeingültigen Regeln, mit deren Hilfe die Sequenzspezifität erklärbar oder vorhersagbar wäre. Prinzipiell resultiert die sequenzspezifische Bindung aus einer individuellen Kombination der verschiedenen möglichen Wechselwirkungen: Den Wasserstoffbrückenbindungen, den van-der-Waals-Kontakten und indirekten durch Wassermoleküle vermittelten Kontakten [UET].

*Luscombe et al.* [LUS] haben eine große Anzahl an Protein-DNA-Komplexen untersucht und gefunden, dass zwei Drittel aller Protein-DNA-Interaktionen *van der Waals*-Kontakte sind und das restliche Drittel je zur Hälfte Wasserstoffbrückenbindungen und durch Wasser vermittelte Bindungen umfasst. Bei allen Bindungstypen besteht der größere Anteil aus Beziehungen zwischen dem Protein und dem Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA. Das heißt, dass die meisten Protein-DNA-Interaktionen der Stabilisierung des Komplexes dienen und nicht direkt sequenzabhängig sind.

Sequenzspezifische Bindungen zwischen DNA-Basen und Proteinen bestehen überwiegend in den großen Furchen der DNA-Moleküle, denn nur dort ist die Unterscheidung zwischen den Basenpaaren GC und CG oder AT und TA eindeutig. Die Kanten der Basenpaare bilden ein typisches Muster von Wasserstoffbrücken-Donoren und -Akzeptoren, das von den Seitenketten der Aminosäuren erkannt werden kann (Abbildung 2.9).



**Abb. 2.9:** Charakteristische Stellen für Wasserstoffbrücken-Donoren (↑) und -Akzeptoren (↓) an den Kanten der Basenpaare CG und TA für die spezifische Erkennung durch Aminosäureseitenketten [HÖG]. M bezeichnet die Methylgruppe von Thymin und  $H_R$  die ringförmigen Wasserstoffbrücken-Donoren.

Mittels Röntgenstrukturanalyse ist für viele Aminosäuren der bevorzugte Wechselwirkungsmodus mit den Basen bestimmt worden. So ist bekannt, dass die positiv geladenen Seitenketten der Aminosäuren Arginin und Lysin bevorzugt Wasserstoffbrücken zu Guanin bilden, die Aminosäuren Asparagin und Glutamin vor allem

Wasserstoffbrücken zu Adenin ausbilden. Bei den *van der Waals*-Kontakten gibt es auch einige Gesetzmäßigkeiten. Arginin bildet bevorzugt *van der Waals*-Kontakte zu Guanin, die Aminosäure Threonin zu Thymin. In Bereichen, in denen die DNA deformiert ist, können Aminosäuren auch hydrophobe Stapel mit den Basen bilden. Dieses ist für die Aminosäuren Phenylalanin, Prolin und Histidin bekannt [UET].

Sequenzspezifische Proteine haben prinzipiell eine hohe DNA-Affinität. Das zeigt sich in den hohen Binde- oder Assoziationskonstanten  $K_a$ , die zwischen  $10^8 \text{ M}^{-1}$  und  $10^{14} \text{ M}^{-1}$  liegen. Bindekonstanten von  $10^6 \text{ M}^{-1}$  zeigen unspezifische Bindungen an. Nach folgender Vorschrift kann die Bindekonstante berechnet werden [LOT]:

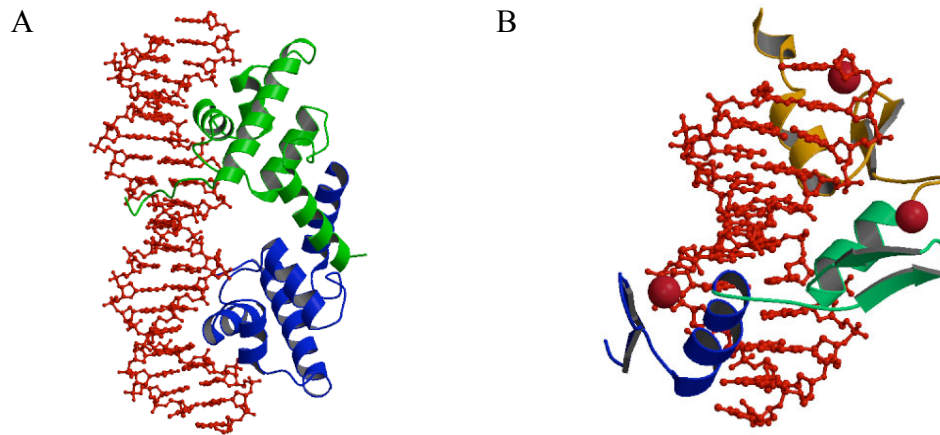
$$K_a [\text{M}^{-1}] = \frac{(DNA \cdot Prot)}{(DNA_0 - DNA_C) \cdot (Prot_0 - Prot_C)} \quad (2.7)$$

Dabei bedeuten  $DNA \cdot Prot$  die Konzentration des Komplexes,  $DNA_0 - DNA_C$  die Konzentration der freien DNA,  $Prot_0 - Prot_C$  die Konzentration des freien Proteins,  $DNA_0$  die Initialmenge der eingesetzten DNA,  $DNA_C$  die Konzentration der DNA im Komplex,  $Prot_0$  die Initialmenge des eingesetzten Proteins und  $Prot_C$  die Konzentration des Proteins im Komplex.

Die Bildung von DNA-Protein-Komplexen kann zu starken Konformationsänderungen der Komplexpartner führen, wenn einer der Partner in eine energetisch ungünstige Konformation gezwungen wird. So kann die DNA-Doppelhelix so gebogen werden, dass sie ihre B-Konformation verlässt, es kann zum lokalen Aufschmelzen, zu Veränderungen der Furchenweite, zu lokaler Aufwindung u. ä. kommen [LOT].

Für die DNA-Bindung gibt es nur eine begrenzte Anzahl an Domänen bzw. Motiven, nach deren Strukturen DNA-bindende Proteine in Gruppen und Untergruppen eingeteilt werden können [UET]. Abbildung 2.10 zeigt zwei Beispiele für solche Bindemotive. Ein sehr häufiges Motiv ist das Helix-turn-Helix-Motiv (HTH-Motiv), das z. B. auch beim Tet-Repressor-Protein auftritt. Dieses Motiv wird durch zwei rechtwinklig zueinander liegende  $\alpha$ -Helices gebildet, die durch eine Schleife ("turn") miteinander verbunden sind. Eine der  $\alpha$ -Helices liegt dabei in der großen Furche der DNA (siehe Abb. 2.10 A). Eine andere große Gruppe bilden die Zink koordinierenden Proteine ("Zinkfingermotiv"). Sie bestehen aus zwei antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern und einer  $\alpha$ -Helix, die von einem Zinkatom in einer lockeren Schlaufe zusammengehalten werden. Das Zinkatom übernimmt die strukturierende Funktion. Die Faltung des Proteins ermöglicht ein dichtes Wickeln um den DNA-Doppelstrang. Die DNA-Bindung erfolgt auch hier durch eine Helix in der großen Furche (siehe Abbildung 2.10 B).





**Abb. 2.10:** Zwei Beispiele für wichtige Bindemotive von Proteinen bei der DNA-Bindung [UET].  
A) Helix-turn-Helix (HTH)-Motiv (am Beispiel des  $\lambda$ -Repressors)  
B) Zinkfingermotiv (am Beispiel des Transkriptionsfaktors Zif268 der Maus).

## 2.5 DNA-Technologie

Um das Biomolekül DNA für den Aufbau von technischen Strukturen nutzen zu können, müssen bestimmte Techniken und Verfahren zu dessen Manipulation angewendet werden. Dabei werden die in den vorangegangenen Kapiteln behandelten mechanischen und chemischen Eigenschaften des DNA-Moleküls ausgenutzt. Damit aufgebaute Strukturen oder Einzelmoleküle mit dem Fluoreszenzmikroskop untersucht werden können, ist es z. B. notwendig, DNA mit Fluoreszenzfarbstoff zu markieren. Hierbei spielt die Fähigkeit der DNA zur chemischen Bindung von interkalierenden Liganden eine wichtige Rolle. Eine andere Technik, die notwendig ist, um DNA-Fragmente bestimmter Länge und Basensequenz aus einem großen Molekül zu schneiden, ist der Verdau mit Hilfe von Restriktionsenzymen. Dabei wird die sequenzspezifische Erkennung und Bindung von Proteinen, in diesem Fall von Restriktionsendonukleasen, gezielt genutzt. Bei dem Verfahren des *Molecular Combing* werden DNA-Moleküle gestreckt und auf einer Oberfläche abgelegt. Hierbei kommt es auf große mechanische Stabilität an, denn es können Kräfte von über 100 pN auf das Molekül wirken, wenn es stark überstreckt wird. Gleichzeitig muss die DNA denaturierenden Kräften standhalten, die aufgrund des Einbaus von Interkalatoren bei der Markierung und aufgrund der Adsorption auf einer Oberfläche auftreten. Auch beim *Transfer Printing* spielt die mechanische Stabilität während der Übertragung der Moleküle von der Stempeloberfläche auf das Substrat eine bedeutende Rolle.

In den nachfolgenden Abschnitten werden sowohl die Techniken des Markierens und Schneidens von DNA-Molekülen und deren Einfluss auf die Eigenschaften der DNA

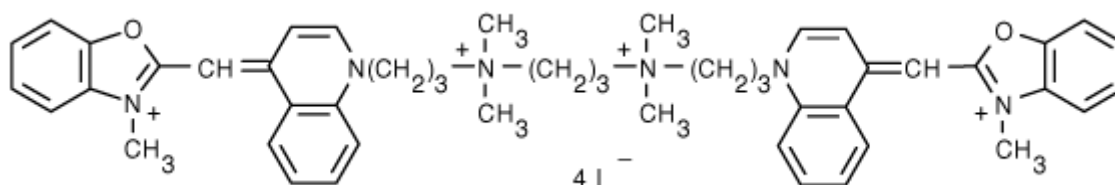


behandelt als auch die beiden Verfahren *Molecular Combing* und *Transfer Printing* beschrieben, die alle grundlegende Methoden für die in dieser Arbeit erzeugten DNA-Strukturen sind.

### 2.5.1 Markieren mit interkalierenden Liganden

Unter Interkalation versteht man eine spezielle Bindungsform, bei der ein Liganden-Molekül zwischen zwei gestapelte Basen eingeschoben wird. Um interkalieren zu können, müssen diese Liganden eine planare Struktur haben. Diese Voraussetzung wird von Farbstoffen, wie z. B. Ethidiumbromid oder YOYO-1-Jodid, erfüllt. Während der Interkalation interagieren die aromatischen Ringe der Farbstoffmoleküle mit den heteroaromatischen Ringen der Basen der DNA.

In der vorliegenden Arbeit wurden DNA-Moleküle für alle fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen mit dem DNA-Marker YOYO-1-Jodid markiert. Dieser Fluoreszenzfarbstoff bindet hochspezifisch an doppelsträngige DNA, die Bindekonstante liegt im Bereich zwischen  $10^{10}$  und  $10^{12} \text{ M}^{-1}$  [GLA]. Abbildung 2.11 zeigt die Strukturformel dieses Dimers. Bei Anregung mit Licht wird der gebundene Farbstoff zur Fluoreszenz angeregt, dabei beträgt die Wellenlänge der maximalen Absorption 491 nm, das Intensitätsmaximum des emittierten Fluoreszenzlichtes liegt bei einer Wellenlänge von 509 nm. Freier, ungebundener Farbstoff fluoresziert mit 100- bis 1000-fach geringerer Intensität [RYE].



**Abb. 2.11:** Strukturformel des DNA-Marker-Dimers YOYO-1-Jodid ( $\text{C}_{49}\text{H}_{58}\text{J}_4\text{N}_6\text{O}_2$ ). Das Molekulargewicht beträgt 1270,65 Da [MOL].  $1 \text{ Da} = 1 \text{ u} = 1,66 \times 10^{-27} \text{ kg}$ .

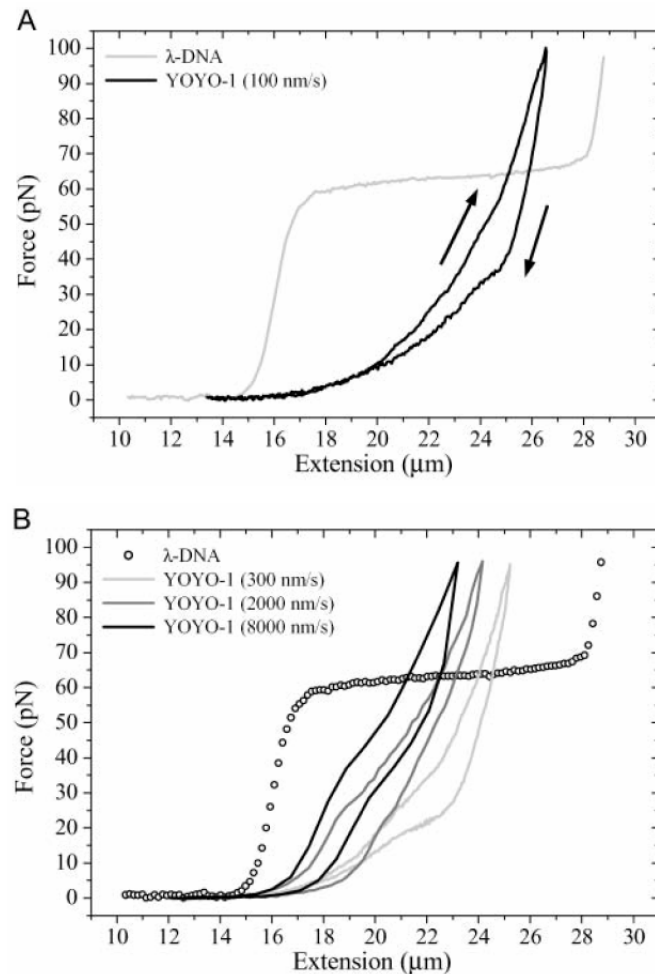
Das Einschieben von Interkalatoren zwischen die Basen der DNA hat großen Einfluss auf die Struktur eines DNA-Moleküls. So kann es zur Längenänderung des DNA-Moleküls und zum lokalen Auftrennen von Basenpaaren führen. Außerdem sind Krümmungen und Verzerrungen des DNA-Rückgrates charakteristisch [BLA]. Starke Strukturänderungen treten insbesondere dann auf, wenn es sich beim interkalierenden Molekül um solch ein

großes Dimer wie das YOYO-1-Jodid, einen so genannten Bisinterkalator, handelt. Bisinterkalatoren bestehen aus zwei aromatischen Ringsystemen, die durch einen Linker miteinander verbunden sind (siehe Abbildung 2.11).

Ein DNA-Strang kann nur eine bestimmte Anzahl an Liganden interkalierend binden. *Larsson et al.* [LAR] fanden heraus, dass Interkalation bis zu einer Markierungsrate (YOYO-1/Basenpaar-Verhältnis) von 0,125 möglich ist. Das entspricht einem Verhältnis von einem YOYO-1-Molekül pro acht Basenpaare. Bei einer Markierungsrate, die größer als 0,125 ist, spielt zusätzlich ein zweiter Bindungsmodus, die externe Bindung, eine Rolle. Dabei bindet das Markermolekül auf der DNA-Oberfläche in einer der beiden Furchen. Aufgrund der positiven Ladung des YOYO-1-Moleküls führt die externe Bindung zu einem Ausgleich der Oberflächenladung der DNA und damit zu einer erhöhten Flexibilität des DNA-Moleküls.

Es führen also beide Bindungsformen zu Strukturänderungen von DNA-Molekülen. Der Einfluss des Bisinterkalators YOYO-1 auf das Verhalten von DNA während des Verdau mit Restriktionsenzymen wurde von *Opitz* [OPI 1] und *Matsuura* [MAT] elektrophoretisch untersucht. Im ersten Fall wurde  $\lambda$ -DNA markiert, wobei die Markierungsrate zwischen 0,02 und 0,18 lag. Anschließend wurde versucht, die DNA mit der Restriktionsendonuklease *SnaBI* zu schneiden. Es konnte gezeigt werden, dass mit steigender Markierungsrate der Anteil an geschnittener DNA abnahm und erst bei der höchsten Markierungsrate von 0,18 das Schneiden vollständig verhindert worden war. Der Interkalationsmechanismus allein stört also den Verdau durch Enzyme nicht, erst die externe Bindung von Liganden auf der DNA-Oberfläche verhindert das Ablesen der Basensequenz. In einem weiteren Experiment konnte nachgewiesen werden, dass sich bei  $\lambda$ -DNA mit steigender Markierungsrate der Laufweg im Agarosegel verkürzt. Diese Laufwegverkürzung erfolgt kontinuierlich und rührt vermutlich von der zunehmenden Umladung der DNA durch das positiv geladene Markermolekül her. Bei Experimenten von *Matsuura* wurde sogar erreicht, dass stark mit YOYO-1 markierte DNA (Markierungsrate  $>1$ ) während der Gelelektrophorese zur negativ geladenen Elektrode migrierte. Außerdem beobachtete diese Arbeitsgruppe die Be- bzw., bei externer Bindung, Verhinderung des DNA-Abbaus durch eine sequenzunspezifisch wirkende Exonuklease.

Der Einfluss der Fluoreszenzmarkierung mit YOYO-1 auf das mechanische Verhalten von Einzelmolekülen bei Dehnungs- und Relaxationsexperimenten wurde von *Sischka* [SIS] untersucht. Auch bei diesen mechanischen Tests war die Markierungsrate der DNA so hoch, dass man nicht nur vom Interkalationsmechanismus, sondern auch von externer Bindung des Liganden ausgehen muss. Es wurden Kraft-Dehnungs-Experimente durchgeführt, wobei die Geschwindigkeit der Dehnung variiert wurde.



**Abb. 2.12:** Kraft-Verlängerungs-Kurven für YOYO-1-markierte  $\lambda$ -DNA im Vergleich zu freier  $\lambda$ -DNA [SIS].

YOYO-1-markierte DNA-Moleküle zeigen bei niedrigen (A) und auch bei hohen (B) Dehnungs- und Relaxationsgeschwindigkeiten Hystereseeffekte, außerdem fehlt die Plateauphase der Umwandlung während der Überstreckung. Bei zunehmender Geschwindigkeit werden die Elastizitätskurven zu niedrigeren Dehnungswerten verschoben.

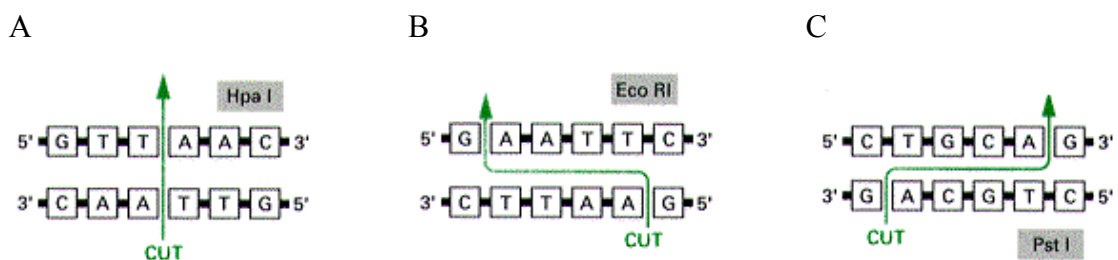
Die Kurven, in Abbildung 2.12 dargestellt, unterscheiden sich in ihrem Verlauf grundsätzlich von denen für ungebundene DNA und zeigen für YOYO-1-markierte Moleküle ausgeprägte Hystereseeffekte. Die Lage der Hysteresekurve ist dabei von der Geschwindigkeit und auch von der Höhe der maximal aufgebrauchten Kraft abhängig. Mit steigender Geschwindigkeit verschieben sich die Kurven zu kleineren Verlängerungswerten. Da alle Hystereseeffekte sehr gut reproduzierbar sind, wird davon ausgegangen, dass sie nicht auf Aufschmelzeffekte zurückzuführen sind. Vielmehr gehen die Autoren davon aus, dass sich die mit interkalierenden Liganden komplexierten DNA-Stränge während des Aufbringens der Zugkraft nicht im Gleichgewichtszustand befinden und verweisen auf ein Modell zur Ausdehnung von Biomolekülen von *Rief et al.* [RIE], bei dem jedes Segment des Moleküls Konformationsänderungen eingeht. Nach einem Fit der experimentellen Daten mit Hilfe des *Worm-like-chain*-Modells werden molekulare Parameter für markierte und freie  $\lambda$ -DNA ermittelt und bedeutende Unterschiede festgestellt. So verringert sich die Persistenzlänge von 40 nm für ungebundene DNA auf 11,8 nm für YOYO-1-markierte Moleküle, die Konturlänge steigt von 16,0  $\mu\text{m}$  auf 21,8  $\mu\text{m}$  (bei hoher Markierungsrate von 1,25 YOYO-1-Molekülen pro Basenpaar [SIS]). Die starke Verringerung der Persistenzlänge wird mit dem Ladungsausgleich des DNA-

Rückgrates durch positiv geladene YOYO-1-Liganden erklärt. Die Interkalation ist der Grund für die Verlängerung der Konturlänge.

Aufgrund des Wissens um die Strukturveränderungen von DNA-Molekülen beim Markieren mit dem Fluoreszenzfarbstoff YOYO-1-Jodid sollte die Markierungsrate so optimiert werden, dass eine Untersuchung der Moleküle mit dem Fluoreszenzmikroskop bei minimaler Beeinflussung der molekularen Parameter möglich ist. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb die Markierungsrate niedrig gehalten. Sie lag in der Regel bei 0,05, also im Bereich der interkalativen Bindung zwischen DNA und Markermolekül.

## 2.5.2 Schneiden mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind wichtige Werkzeuge der Molekularbiologie und der Biotechnologie, mit deren Hilfe es möglich ist, DNA-Moleküle sequenzspezifisch zu zerlegen. Es sind DNA-abbauende Enzyme, die Phosphodiesterbindungen an definierten Stellen innerhalb des DNA-Moleküls hydrolytisch spalten und somit DNA an vorbestimmbaren Orten schneiden. Diese Enzyme erkennen kurze Nukleotidfolgen und schneiden entweder direkt an der Erkennungssequenz oder auch ein Stück entfernt von ihr. Erkennungssequenzen bestehen aus vier bis acht spezifischen Basenpaaren und haben oft palindromischen Charakter. Manche Endonukleasen schneiden die DNA-Doppelstränge glatt durch und es entstehen so genannte *blunt ends*, andere versetzt, sodass Einzelstrangüberhänge, so genannte *sticky ends*, entstehen (Abbildung 2.13).



**Abb. 2.13:** Beispiele für Schnittmuster von Restriktionsendonukleasen: Beim Verdau entstehen entweder *blunt ends* (A), *sticky ends* mit 3'-Überhang (B) oder *sticky ends* mit 5'-Überhang (C).

Neben der Erzeugung von DNA-Fragmenten mit bestimmter Länge und Sequenz kann enzymatisches Schneiden auch zur Sequenzanalyse beitragen. Hierbei wird versucht, die zu untersuchende DNA nacheinander mit mehreren Restriktionsenzymen zu verdauen, um

nach elektrophoretischer Auftrennung der entstandenen Fragmente die gesuchte Sequenz zu detektieren oder auch auszuschließen.

Es gibt drei Typen von Restriktionsenzymen, die sich in ihren Funktionen unterscheiden [LOT, KNI 1, MÜL]. Für die Analytik werden jedoch in der Regel die in diesem Abschnitt charakterisierten Enzyme vom Typ II verwendet, von denen mehr als 2000 mit über 200 verschiedenen Erkennungssequenzen bekannt sind. Sie spalten DNA, im Gegensatz zu Enzymen der anderen Typen, innerhalb oder nahe der Erkennungsstelle.

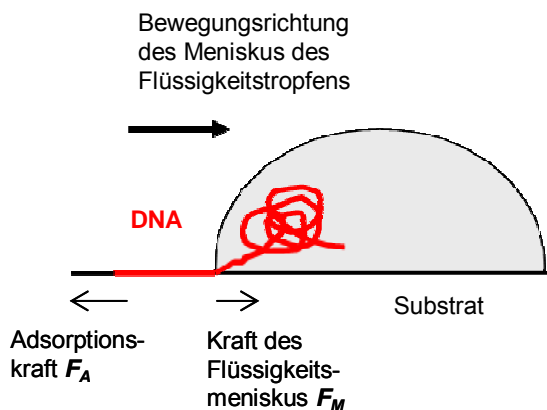
Die biologische Funktion der Restriktionsenzyme besteht darin, in ihren Ursprungsorganismus eingedrungene Fremd-DNA zu zerkleinern und zu inaktivieren. Die zelleigene DNA wird dabei durch eine Modifikation, meistens eine Methylierung, vor dem Abbau durch eigene Restriktionsenzyme geschützt [LOT].

### 2.5.3 Molecular Combing

Mit dem Begriff *Molecular Combing* ("Molekulares Kämmen") von DNA bezeichnet man eine Methode, bei der Moleküle aus einer Lösung auf einer Festkörperoberfläche abgeschieden werden und währenddessen aus der Knäuelform in die gestreckte Konformation übergehen. Die Knäuel der DNA-Moleküle werden "ausgekämmt".

Die Adsorption der DNA-Moleküle beginnt mit dem zufälligen Zusammentreffen eines Moleküles mit der Unterlage. Sie ist stark von den Versuchsbedingungen, wie dem pH-Wert der DNA-Lösung und dem Charakter der Oberfläche hinsichtlich Hydrophobie, abhängig. Die teilweise adsorbierten Moleküle werden anschließend durch die lokale Kraftwirkung eines die Oberfläche überstreichenden Flüssigkeitsmeniskus gestreckt und adsorbieren schrittweise in gestreckter Form.

In Abbildung 2.14 ist das Prinzip des *Molecular Combing* dargestellt. Es ist bei relativ einfacher Handhabung eine leistungsfähige Methode, um auch lange DNA-Moleküle, wie z. B.  $\lambda$ -DNA, zu orientieren und anzuordnen. Auch die Erzeugung von zweidimensionalen Netzwerken ist möglich (siehe Abbildung 2.15).



**Abb. 2.14:** Prinzip des *Molecular Combing*: Das DNA-Molekül bindet mit einem Ende am Substrat und wird durch die Bewegung des Flüssigkeitsmeniskus gestreckt.

1994 wurde die Methode des *Molecular Combing* von der Arbeitsgruppe um D. Bensimon und V. Croquette vorgestellt [BEN 1]. Seitdem ist eine Reihe von Publikationen zu diesem Thema erschienen, die sich zum großen Teil mit der Anwendung dieser Methode (z. B. [NAK 1, OPI 2, KLE, HU, DEN]) und zum kleineren Teil mit der Untersuchung der zugrunde liegenden Adsorptions- und Streckmechanismen der DNA befassen [BEN 2, ALL, LIU 1]. So gibt es Untersuchungen zum Einfluss chemischer Parameter, wie z. B. pH-Wert und Ionenstärke der DNA-Lösung und Hydrophobie/Hydrophilie der Substratoberfläche und zum Einfluss physikalischer Versuchsbedingungen, wie der Geschwindigkeit des Flüssigkeitsmeniskus und der Oberflächenspannung der Lösung.

Trotzdem ist der Mechanismus, insbesondere der der Adsorption von DNA-Molekülen auf Oberflächen, noch nicht vollständig geklärt. Die Ergebnisse eigener Experimente unterscheiden sich teilweise deutlich von denen aus der Literatur. Im folgenden Abschnitt soll zunächst der publizierte Stand der Wissenschaft kurz dargestellt werden.

Bei den ersten *Molecular-Combing*-Experimenten wurden DNA-Moleküle auf einer silanisierten Glasoberfläche gestreckt, indem die Kraftwirkung der sich bewegenden Flüssigkeitsfront während des Eintrocknens eines Tropfens mit DNA-Lösung genutzt wurde [BEN 1]. Die endspezifische Anbindung am Substrat erfolgte elektrostatisch an den exponierten Vinylgruppen der Glasbeschichtung. Beim Trocknen des Tropfens wurde beobachtet, dass an die Substratoberfläche gebundene Moleküle vollständig gestreckt wurden, während ungebundene Moleküle mit der Flüssigkeitsfront weggespült wurden. Außerdem wird *Molecular Combing* als ein irreversibler Prozess beschrieben, ein Wiederbefeuchten löst einmal gebundene Moleküle nicht ab. Die Kraft des Flüssigkeitsmeniskus auf die DNA muss groß genug sein, um das Molekül zu strecken, darf aber die Bindung zwischen Molekül und Oberfläche nicht zerstören.

Der Grad der Streckung der DNA-Moleküle ist von den **Oberflächeneigenschaften** des Substrates abhängig [BEN 2]. Auf hydrophoben Oberflächen lassen sich die Moleküle deutlich länger strecken als auf hydrophilen Oberflächen. So kann auf hydrophoben Substraten eine Länge erreicht werden, die dem 1,7-fachen der Konturlänge entspricht.

Ein weiterer wichtiger Einflussfaktor auf das *Molecular Combing* ist der **pH-Wert** der DNA-Lösung, denn dieser beeinflusst die Stabilität sowie das teilweise Aufschmelzen der DNA und damit die Fähigkeit zur Adsorption des Moleküls. Unabhängig von der Art der Oberfläche wurde folgendes beobachtet [ALL]: Bei niedrigem pH-Wert ist die DNA-Adsorption stark und unspezifisch, die Moleküle lassen sich kaum strecken. Bei hohem pH-Wert wiederum ist die Adsorption schwach, die DNA-Moleküle werden mit dem sich bewegenden Meniskus mitgezogen. Zwischen diesen pH-Bereichen gibt es ein schmales pH-Optimum, bei dem die Adsorption stark und trotzdem endspezifisch stattfindet.

In Abhängigkeit von der Hydrophilie des Substrates werden verschiedene Adsorptionsmechanismen und unterschiedliche pH-Optima für die endspezifische Adsorption diskutiert:

Auf hydrophilen Oberflächen wie z. B. gereinigtem oder mit Aminosilan (APTES) beschichtetem Glas wurde der pH-Wert für die endspezifische Adsorption mit 8,8 ermittelt. Die Adsorption der DNA-Moleküle auf dem Substrat basiert dabei auf elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen der negativ geladenen DNA und den protonierten, also positiv geladenen Aminogruppen des Glassubstrates. Die endspezifische Adsorption beruht auf der geringfügig stärkeren negativen Ladung der DNA-Enden, die sich durch ein zweites nicht abgesättigtes Sauerstoffion an den Phosphatgruppen der offenen Enden der Einzelstränge ergibt.



Auf hydrophoben Oberflächen, wie z. B. Polystyrol, ist der pH-Wert für die spezifische Adsorption deutlich kleiner, er liegt bei 5,5. Es wird außerdem ein anderer Adsorptionsmechanismus diskutiert: Hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Teilen des hydrophoben Kerns der DNA-Moleküle und dem hydrophoben Substrat. In diesem Fall beruht die endspezifische Adsorption auf dem offen liegenden hydrophoben Bereich der *sticky ends* oder bei deren Fehlen auf dem Start des Aufschmelzens an den DNA-Enden. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von *Allemand et al.* [ALL], die nur einen sehr engen pH-Bereich für die endspezifische Adsorption angeben, konnte durch eigene Experimente gezeigt werden, dass auf dem stark hydrophoben Substrat PDMS (Polydimethylsiloxan) dieser Bereich auf pH-Werte zwischen 4 und 10 ausgedehnt werden kann (siehe Kapitel 3).

Die Zugabe von **Natrium- und Magnesiumionen** zur DNA-Lösung beeinflusst ebenfalls das *Molecular Combing* [LIU 1]. Bei geringer Ionenstärke wurde ein großer Anteil an kurzen DNA-Fragmenten beobachtet, während bei hoher Ionenstärke die Moleküle stark überstreckt waren und ihre Länge das 1,7-fache der Konturlänge erreichte.

*Molecular Combing* von DNA-Molekülen kann mit verschiedenen Techniken realisiert werden, wesentlich ist die Bewegung eines Flüssigkeitsmeniskus zur Erzeugung der Meniskuskraft. So gibt es die Möglichkeit, einen Tropfen eintrocknen zu lassen und dabei die Bewegung der Tropfenfront zu nutzen [BEN 1, LIU 1]. Eine andere Variante ist das Eintauchen und Herausziehen eines Substrates aus der DNA-Lösung [ALL, GUE, KLE]. Diese Technik hat gegenüber der Verdunstungsmethode große Vorteile: aufgrund der Inkubation in einem größeren Puffervolumen spielen pH-Veränderungen durch das Lösen von CO<sub>2</sub> keine Rolle. Außerdem bleibt die Konzentration der DNA-Lösung konstant, was beim Eintrocknen eines Tropfens nicht der Fall ist. Eine weitere Möglichkeit ist das Schieben eines Tropfens DNA-Lösung über eine Oberfläche mit Hilfe von Druckluft [DEN], mit einer motorgetriebenen Apparatur [YOK] oder mittels eines Mikroinjektors [OTO].

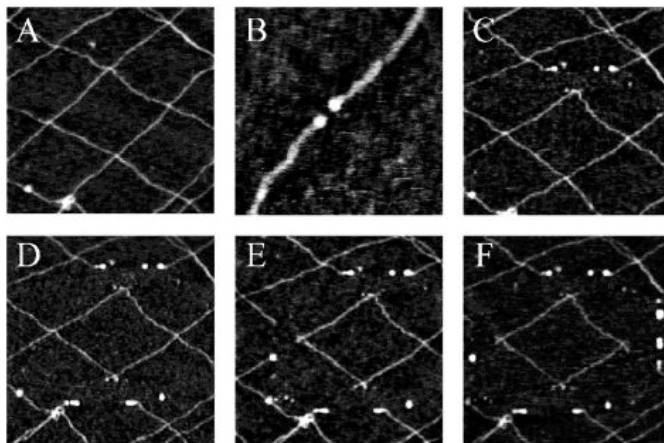
Durch die Kenntnis der das *Molecular Combing* beeinflussenden Faktoren, wie Oberflächeneigenschaften des Substrates, pH-Wert und Salzkonzentration der DNA-Lösung, ist es möglich, die Kraftwirkung auf das Molekül und damit die Dehnung desselben einzustellen. So wurde z. B. untersucht, bis zu welchem Dehnungsgrad eine adsorbierte DNA mit einem Bindeprotein in Wechselwirkung treten kann [GUE]. Dazu wurde die DNA-Streckung durch Änderung der Benetzung infolge alkoholischer Zusätze variiert. Es konnte nur im nicht überstreckten Zustand der DNA eine Wechselwirkung mit dem Protein nachgewiesen werden.

Bei anderen *Molecular-Combing*-Experimenten wurde die Oberfläche des Substrates gezielt verändert. Glimmeroberflächen wurden durch einen Monolayer aus Aminopropyltriethoxysilan chemisch modifiziert und anschließend ein- und zweidimensionale DNA-Strukturen erzeugt [OUY]. Glasoberflächen wurden mit



verschiedenen Polymeren (z. B. Polyvinylbutyral, Polyvinylcarbazol) beschichtet, um die Hydrophilie des Glases zu verringern und die Wechselwirkungen zwischen DNA und Substrat kontrollieren zu können [NAK 1]. DNA-Einzelmoleküle konnten ortsspezifisch auf mikrostrukturierten Aminoterpolymer-Filmen immobilisiert und gestreckt werden. Diese Filme werden mittels UV-Licht strukturiert, indem nach gezielter Beseitigung fotolabiler Gruppen Aminogruppen zur endspezifischen DNA-Adsorption freigelegt werden [OPI 2]. Für eine andere Anwendung wurden auf einem Glasträger Polystyrolbahnen aufgebracht und DNA-Moleküle senkrecht dazu gespannt. Hier wurde die starke Adsorption der DNA-Enden auf dem hydrophoben Material Polystyrol für eine Strukturbildung ausgenutzt [KLE].

Dass die Methode des "Molekularen Kämmens" Grundlage für weiterführende Untersuchungen an DNA-Molekülen ist, zeigt das folgende Experiment. Es ist eine Kombination aus *Molecular Combing* und *Molecular Cutting* (molekulares Schneiden) [HU]. In einem ersten Schritt wurde aus DNA-Strängen ein zweidimensionales Netzwerk hergestellt, das danach mit Hilfe des Rasterkraftmikroskopes so zerschnitten wurde, dass die gewünschte künstliche DNA-Struktur entstand (Abbildung 2.15).



**Abb. 2.15:** Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen von der Entstehung eines DNA-Netzwerkes durch *Molecular Cutting* auf silanisiertem Glimmer mittels *Tapping Mode* an Luft (Seitenlänge eines Teilbildes entspricht 800 nm, bei Teilbild B 300 nm).

**A:** Zweidimensionales Netzwerk nach *Molecular Combing*.

**B:** Schneiden der DNA mit der AFM-Spitze. Der DNA-Strang bricht nach mehreren Scans bei ausreichender Belastung.

**C-F:** Weitere Strukturierung durch Schneiden und Weggreifen der nicht benötigten Stränge [HU].

Diese DNA-Netzwerke können metallisiert werden und die Nanodrähte für den Aufbau von elektronischen Strukturen in Nanometergröße dienen. So berichten z. B. *Deng et al.* von stromloser Metallisierung von adsorbierten, parallelen und gekreuzten DNA-Strängen mit Palladium [DEN].

Nach dieser Darstellung von Publikationen zur Anwendung des *Molecular Combing* soll nun in den nächsten Abschnitten versucht werden, ein Modell zu entwickeln, das die Kraftwirkungen auf das DNA-Molekül während des Streckens und der Adsorption beschreibt. Ausgangspunkt hierfür bildet die Abbildung 2.14.

Für einen erfolgreichen *Molecular-Combing*-Prozess muss die folgende Beziehung zwischen der Adsorptionskraft  $F_A$ , der Kraft des Flüssigkeitsmeniskus  $F_M$  und der entropischen Kraft zur Aufrechterhaltung der Knäuelkonformation  $F_E$  gelten:

$$F_A > F_M > F_E \quad (2.8)$$

Um eine Gleichung zur Beschreibung der Meniskuskraft  $F_M$  herzuleiten, soll die verrichtete Arbeit  $\delta W$  beim Herausziehen einer DNA aus einer Flüssigkeit um das Wegstück  $\delta s$  betrachtet werden. Das DNA-Molekül wird dabei als geschlossene Röhre mit einem Durchmesser  $D$  und einer Mantelfläche  $A_M$  angesehen.  $\Delta\gamma_{DNA}$  beschreibt die Differenz der Oberflächenenergien der DNA im gestreckten Zustand gegenüber Luft und in der Knäuelkonformation in der Flüssigkeit.

$$\delta W = F_M \cdot \delta s$$

$$\delta A_M = \pi D \cdot \delta s$$

$$\delta s = \frac{\delta A_M}{\pi D}$$

$$\delta W = F_M \cdot \frac{\delta A_M}{\pi D}$$

$$\frac{\delta W}{\delta A_M} = \frac{F_M}{\pi D} = \Delta\gamma_{DNA}$$

$$F_M = \Delta\gamma_{DNA} \cdot \pi D \quad (2.9)$$

Werden für die Abschätzung der Meniskuskraft, einem Modell von *Bensimon* [BEN 1] folgend, für  $\Delta\gamma_{DNA} = \gamma_{H_2O} = 7 \cdot 10^{-2}$  N/m (Oberflächenspannung des Wassers) und  $D = 2$  nm gewählt, ergibt sich eine Kraft von ca. 400 pN. Nach Betrachtung des Kraft-Verlängerungs-Diagramms für DNA, das die Fließgrenze bei ca. 65 pN und ein Aufschmelzen des Doppelstranges bei Werten von über 100 pN zeigt, erscheint dieser Wert für  $F_M$  als zu groß.

Es ist deshalb notwendig, die Einflussgröße  $\Delta\gamma_{DNA}$  genauer zu beschreiben. Hier fließt die Wechselwirkung der DNA mit dem Flüssigkeitsmeniskus ein. Diese Wechselwirkung ist vom Ladungs- und Denaturierungszustand der DNA abhängig, der wiederum vom pH-Wert und Salzgehalt der Flüssigkeit beeinflusst wird.

Während des Herausziehens der DNA aus dem Flüssigkeitstropfen setzt sich  $\Delta\gamma_{DNA}$  aus der Differenz aus  $\gamma_{DNA}$  an Luft und  $\gamma_{DNA}$  des Knäuels, das sich noch in Flüssigkeit befindet, zusammen:

$$\Delta\gamma_{DNA} = \gamma_{DNA,Luft} - \gamma_{DNA,Knäuel} \quad (2.10)$$

$$\gamma_{DNA,Knäuel} = \gamma_{DNA,H_2O} - \gamma_{Interaktion} \quad (2.11)$$

(Dabei soll gelten:  $\gamma_{DNA,Knäuel} < \gamma_{DNA,Luft}$  und  $\gamma_{Interaktion} < \gamma_{DNA,H_2O}$ .)

$\gamma_{DNA,H_2O}$  beschreibt die Grenzflächenspannung eines einzelnen DNA-Segments in Wasser und  $\gamma_{Interaktion}$  einen zusätzlichen Wechselwirkungsterm, in dem die Neigung der DNA zur Knäuelbildung erfasst werden soll. Er wird mit der Dichte des DNA-Knäuels anwachsen. Es soll eine Situation betrachtet werden, in der die DNA nach Abstreifen der Flüssigkeit als gestreckter Faden, also nicht als Knäuel auf dem Substrat vorliegt.

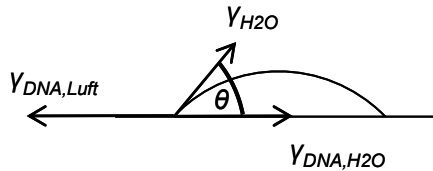
Nach Einsetzen von (2.11) in (2.10) erhält man:

$$\Delta\gamma_{DNA} = \gamma_{DNA,Luft} - \gamma_{DNA,H_2O} + \gamma_{Interaktion} \quad (2.12)$$

Wird das Gleichgewicht der Grenzflächenspannungen zwischen DNA, Wasser und Luft betrachtet (siehe Abbildung 2.16), dann kann formuliert werden:

$$\gamma_{DNA,Luft} = \gamma_{DNA,H_2O} + \gamma_{H_2O} \cdot \cos \theta \quad (2.13)$$

$$\gamma_{DNA,Luft} - \gamma_{DNA,H_2O} = \gamma_{H_2O} \cdot \cos \theta \quad (2.14)$$



**Abb. 2.16:** Gleichgewicht der Grenzflächenspannungen am System DNA, Wasser und Luft.

Nach Einsetzen von (2.14) in (2.12) ergibt sich:

$$\Delta\gamma_{DNA} = \gamma_{H_2O} \cdot \cos \theta + \gamma_{Interaktion} \quad (2.15)$$

Die Kraftwirkung des Flüssigkeitsmeniskus auf die DNA  $F_M$  kann nun mit Hilfe von  $\Delta\gamma_{DNA}$  und Gleichung (2.9) wie folgt berechnet werden:

$$F_M = (\gamma_{H_2O} \cdot \cos \theta + \gamma_{Interaktion}) \cdot \pi D \quad (2.16)$$

In dieser Gleichung (2.16) wird nun die Wechselwirkung der DNA mit dem Flüssigkeitsmeniskus berücksichtigt. Salzgehalt und pH-Wert der Lösung beeinflussen die

Eigenschaften der DNA in Lösung hinsichtlich Knäuelbildung, Ladungs- und Denaturierungszustand und damit die Wechselwirkungen zwischen DNA und Meniskus beim Herausziehen und Strecken des Moleküls. Im Rahmen des Modells können zwei Abhängigkeiten der Meniskuskraft unterschieden werden, diejenige vom Benetzungsverhalten, beschrieben durch den Kontaktwinkel, sowie diejenige von der durch die Entropie getriebenen Knäuelbildung der DNA.

### **Zusammenhang zwischen kritischer Meniskuskraft $F_M$ und dem Benetzungsverhalten der DNA**

Um einen Anhaltspunkt für die Größe der auftretenden Kraft zu erhalten, wird für den Kontaktwinkel zunächst angenommen, dass ideale Benetzung der DNA (hydrophile Wechselwirkung) vorliegen möge. In diesem Fall würde gelten:

$$F_M = (\gamma_{H_2O} + \gamma_{Interaktion}) \cdot \pi D > \gamma_{H_2O} \cdot \pi D \approx 400 \text{ pN} \quad (2.17)$$

Wie bereits oben angedeutet, ist das eine ungewöhnlich große Kraft, die auf die DNA wirken sollte, um sie aus dem Tropfen herauszuziehen. Es ist zu erwarten, dass bereits vor Erreichen dieser Kraft strukturelle Änderungen an der DNA auftreten, die dann zu einer Änderung der Wechselwirkung der DNA mit dem wässrigen Medium führen. Im nicht denaturierten Zustand verhält sich die Außenseite der DNA aufgrund der Ladungen am Phosphatrückgrat hydrophil und die innen liegenden Basen hydrophob. In dem Maße, wie die Denaturierung des Moleküls zunimmt, wird durch die nach außen gekehrten hydrophoben Basen die Außenseite des gesamten Moleküls hydrophober. Dieser Wechsel in den denaturierten Zustand kann zum einen durch eine pH-Wert-Änderung, zum anderen aber auch durch eine zunehmende mechanische Belastung erfolgen. Letzteres wird im Kraft-Verformungs-Diagramm der DNA erkennbar, wenn starke Abweichungen vom elastischen Verhalten auftreten und der Plateaubereich erreicht wird.

Um ein hydrophobes Molekül aus einer wässrigen Lösung zu ziehen, reicht eine kleinere Kraft aus als zum Herausziehen eines hydrophileren Moleküls nötig ist. Dieser Fakt wird in Gleichung (2.16) durch den Faktor  $\cos\theta$  berücksichtigt. Verhält sich die DNA hydrophil, so ist der Kontaktwinkel  $\theta$  klein (siehe Abbildung 2.16). In diesem Fall nähert sich  $\cos\theta$  dem Maximum "1" an und die berechnete Kraft  $F_M$  wird groß. Liegt das DNA-Molekül teilweise denaturiert vor und verhält sich hydrophober, dann wird der Kontaktwinkel  $\theta$  zwischen DNA und Flüssigkeit größer,  $\cos\theta$  kleiner und damit die Kraft  $F_M$  kleiner. Bei Erreichen des Plateaus der Kraft-Verformungs-Kurve kann diese Zunahme des Kontaktwinkels erwartet werden. Es kommt gewissermaßen zu einer Selbstbegrenzung der Meniskuskraft. Die Denaturierung der gestreckten DNA schreitet so weit fort, bis es zu einem Heraustreten der DNA aus der Flüssigkeit kommt.

In Abhängigkeit vom Salzgehalt liegt die Fließgrenze der DNA bei ca.  $65 \text{ pN} \pm 10 \text{ pN}$ . Wird mit Gleichung (2.16) für den Fall des starken Überstreckens, also des Erreichens der Fließgrenze der DNA, der Kontaktwinkel errechnet, dann erhält man einen Wert von ca.  $80^\circ$ . Eine stärkere Hydrophobie ist durch Überstrecken nicht erreichbar. Die Rechnung wurde mit den Werten  $F_M = F_{\text{Fließgrenze}} = 65 \text{ pN}$ ,  $\gamma_{\text{H}_2\text{O}} = 7 \cdot 10^{-2} \text{ N/m}$  und  $D = 2 \text{ nm}$  durchgeführt.

Der pH-Wert der Lösung wirkt durch die mögliche Protonierung oder Deprotonierung der Basen ebenfalls auf den Denaturierungszustand der DNA ein. Eine Vorstellung vom Grad der Denaturierung bei verschiedenen pH-Werten vermitteln die Absorptionsspektren von  $\lambda$ -DNA in Abbildung 3.10 im Kapitel 3.3.4. Außerhalb des physiologischen pH-Bereiches sollte der Umschlag von einer hydrophilen zu einer hydrophoben Oberfläche der DNA, also die Zunahme des Kontaktwinkels bei zunehmender Streckung nicht zu beobachten sein. Vielmehr bietet die bei diesen pH-Werten denaturierte DNA bereits im nicht gestreckten Zustand hydrophobe Bindungen für eine Adsorption am hydrophoben Substrat an. Bei den extrem sauren pH-Werten 2 und 3 adsorbieren die in Lösung vorliegenden DNA-Knäuel nach dem Fortschreiten des Meniskus deshalb bereits in der entropischen Knäuelstruktur (siehe Abbildung 3.7).

### **Einfluss der entropiegetriebenen Knäuelbildung auf die Streckung der DNA**

Wird Salz in die Lösung gegeben, dann verringert sich die Persistenzlänge des DNA-Moleküls infolge einer zunehmenden Abschirmung der negativ geladenen Phosphationen des DNA-Rückgrates. Das Knäuel wird in der salzhaltigen Lösung dichter. Die Kraft, die zum Strecken des Moleküls nun benötigt wird, nimmt deshalb zu. Dieser Sachverhalt wird durch Einführen der Größe  $\gamma_{\text{Interaktion}}$  berücksichtigt. Befindet sich kein Salz in der Lösung, dann nimmt  $\gamma_{\text{Interaktion}}$  einen Minimalwert an. Mit steigendem Salzgehalt wird  $\gamma_{\text{Interaktion}}$  größer und beschreibt damit die Zunahme der Meniskuskraft zum Strecken des Moleküls. Außerdem gibt es einen weiteren Effekt, der durch Salzionen in der Lösung verursacht wird und ebenfalls zu einer Zunahme der kritischen Meniskuskraft beiträgt: Die Stabilisierung des Doppelstranges. Mit steigendem Salzgehalt wird durch die Ladungsabschirmung des Phosphatrückgrates eine Denaturierung der DNA behindert.

### **Adhäsion auf der Stempeloberfläche**

Wie kann nun erklärt werden, dass die Länge gestreckter DNA-Moleküle auf einer hydrophoben Stempeloberfläche deutlich größer ist als auf einer hydrophilen Oberfläche? In der Literatur [ALL, BEN 2] und auch bei eigenen Experimenten wurde dieser Sachverhalt so beobachtet. Es ist nicht richtig, von einer größeren Länge des adsorbierten Moleküls auf eine größere Meniskuskraft beim Strecken zu schließen. Vielmehr muss an dieser Stelle die Adsorptionskraft  $F_A$  berücksichtigt werden:

Das in Lösung hydrophile DNA-Knäuel wird beim Herausziehen aus der Flüssigkeit lokal bis zur Fließgrenze überstreckt und dabei hydrophober, soweit im physiologischen pH-Bereich gearbeitet wird. Wird zur Adsorption eine hydrophobe Oberfläche angeboten, ist  $F_A$  groß und die Adsorption geschieht in denaturiertem und überstrecktem Zustand aufgrund hydrophober Wechselwirkungen. Die Länge des adsorbierten Moleküls ist also groß. Auf einer hydrophilen Oberfläche adsorbiert die DNA aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen. Dafür muss der hydrophobe Kern des Moleküls wieder nach innen zeigen, sodass das geladene Phosphatrückgrat für die Bindung zur Verfügung steht. Dabei muss sich das Molekül zusammenziehen und die Adsorption erfolgt in weniger gestrecktem Zustand oder als Knäuel.

In guter Näherung kann angenommen werden, dass die Kraftübertragung von der Stempeloberfläche auf das DNA-Molekül beim *Molecular Combing* über den Aufbau einer Scherspannung  $\tau_{Adsorption}$  erfolgt, die über eine Länge  $l$  auf das DNA-Molekül einwirken soll.

Entsprechend Gleichung (2.8) gilt für den Fall der Adsorption einer doppelsträngigen DNA:

$$F_A = \tau_{Adsorption} \cdot l \cdot \frac{\pi D}{2} \geq F_M \quad (2.18)$$

Es wird (als maximale Forderung) angenommen, dass das DNA-Molekül mit der Hälfte seiner Mantelfläche auf der Substratoberfläche adsorbiert ist. Die Scherspannung  $\tau_{Adsorption}$  ist von der Grenzflächenenergie zwischen dem Substrat und der DNA  $\gamma_{Grenzfläche}$  abhängig. Näherungsweise kann sie wie folgt abgeschätzt werden:

$$\tau_{Adsorption} = \frac{\gamma_{Grenzfläche}}{a} \quad (2.19)$$

Hierbei bezeichnet  $a$  den Abstand zweier Basen entlang des DNA-Moleküls,  $a = 0,34 \text{ nm}$ .

Zur Abschätzung der Größenordnung der Grenzflächenenergie wird angenommen, dass  $\gamma_{Grenzfläche} = 2 \cdot \gamma_{hydrophob}$  mit  $\gamma_{hydrophob}$  als einem charakteristischen Wert für hydrophobe Oberflächen gilt. Hydrophobe Oberflächen zeichnen sich durch niedrige Oberflächenenergien aus, so beträgt z. B. die Oberflächenenergie von PDMS  $\gamma_{hydrophob} \approx 20 \cdot 10^{-3} \text{ N/m}$  [DOW]. Damit kann die Scherspannung in einem auf einer PDMS-Oberfläche adsorbierten DNA-Molekül wie folgt abgeschätzt werden:

$$\tau_{Adsorption} = 1,2 \cdot 10^8 \text{ N/m}^2 = 120 \text{ pN/nm}^2 \text{ (MPa)} \quad (2.20)$$

Mit Hilfe von Gleichung (2.18) wird nun die DNA-Länge ermittelt, die mindestens auf der Substratoberfläche adsorbiert sein muss, damit das Molekül auf der Oberfläche haften bleibt und nicht durch die Wirkung der Meniskuskraft  $F_M$  mitgezogen wird.

$$l \geq \frac{2 \cdot F_M}{\tau_{\text{Adsorption}} \cdot \pi D} \quad (2.21)$$

Geht man davon aus, dass auf das DNA-Molekül die maximale Meniskuskraft  $F_M = 65$  pN (Fließgrenze der DNA) wirkt, dann wird auf der hydrophoben PDMS-Oberfläche eine adsorbierte Länge  $l$  von 0,2 nm benötigt, um das Molekül zu halten. Es reichen also bereits zwei aufgeschmolzene Basenpaare am Molekülende aus, damit die Adsorption der DNA durch hydrophobe Wechselwirkungen auf einer PDMS-Oberfläche beginnen kann. Das erklärt, dass bei ersten Benetzungsinstabilitäten der DNA am Rand des fortschreitenden Tropfens die stabile Kraftübertragung zwischen Oberfläche und DNA erfolgen kann.

Der sehr kleine Wert für die kritische Übertragungslänge  $l$  bei doppelsträngiger DNA wird in den nachfolgenden Experimenten Bestätigung finden und die hohe Adsorptionsrate bei geschlossenen Plasmiden erklären. Zufällig auftretende Fehlstellen von zwei Basenpaaren sollten demnach für die Adsorption ausreichen (siehe Abschnitt 3.3.3).

Für alle anderen *Molecular-Combing*-Experimente in dieser Arbeit wurde  $\lambda$ -DNA verwendet, die 12 bp-lange *sticky ends* besitzt. Diese Einsträngigkeit der zur Adsorption der DNA wesentlichen DNA-Enden verlangt eine Korrektur von Gleichung (2.21). Auf den Einzelstrang wird aufgrund des geringeren Querschnittes pro Längenelement eine geringere Kraft bei der Scherbelastung übertragen. Wird deshalb in Gleichung (2.21) für die Auflagefläche nur  $D \cdot \frac{1}{4}$  des Umfanges des Doppelstranges angenommen, so verdoppelt sich die für die Adsorption benötigte Länge für die Krafteinleitung (z. B. hier von zwei Basenpaaren auf vier Basen).

Wird eine hydrophilere Substratoberfläche für den *Molecular-Combing*-Prozess verwendet, dann kommt es zu einer Abnahme der übertragbaren maximalen Scherspannung  $\tau_{\text{Adsorption}}$  zwischen einer gestreckten DNA (hydrophob) und dem Substrat. Entsprechend Gleichung (2.21) vergrößert sich die für die Übertragung der kritischen Meniskuskraft  $F_M$  benötigte Wechselwirkungslänge  $l$ .

Damit DNA-Moleküle in gestreckter Form adsorbieren, muss die Länge  $l$  immer kleiner als die Persistenzlänge der DNA sein. Die Persistenzlänge für den Doppelstrang beträgt ca. 50 nm oder 150 Basenpaare [MAR]. Somit ist bei zunehmender Hydrophilie des Substrates der Übergang zur Abscheidung von ungeordneten, knäuelförmigen DNA zu erwarten.

Das Anbieten von einzelnen kovalenten Bindungsstellen auf dem Substrat kann ebenfalls für die notwendige Kraftübertragung bei der Streckung durch den sich bewegenden Meniskus genutzt werden. Eine kovalente Bindung kann Kräfte im Bereich von nN



übertragen [BEN 1], d. h. eine kovalente Bindung, ausgehend von einem Nukleotid, reicht demnach für die Adsorption der DNA aus.

Sollen nach der Anordnung von gestreckten DNA-Molekülen auf einer Stempeloberfläche diese in einem nächsten Schritt, dem *Transfer Printing*, auf eine andere Oberfläche übertragen werden, dann wird eine kovalente Bindung der DNA im Vergleich zur hydrophoben Bindung ein praktisch nicht überwindbares Hindernis darstellen.

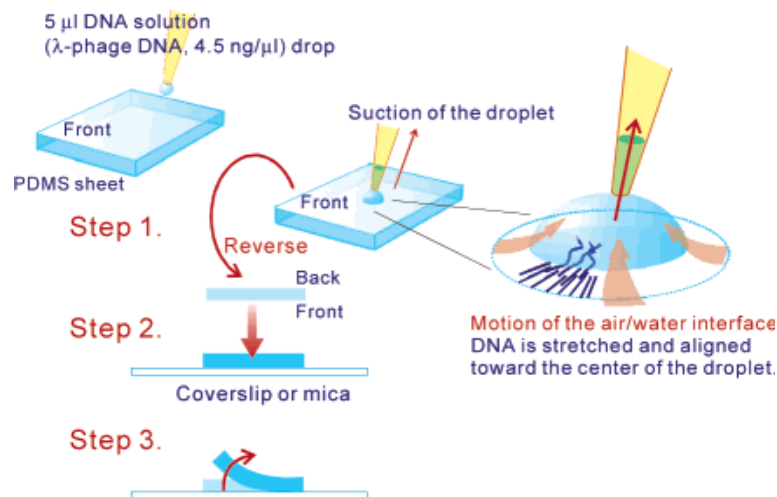
#### 2.5.4 *Transfer Printing*

Mit *Transfer Printing* wird ein neuartiges Stempelverfahren zur zielgerichteten Immobilisierung von gestreckten DNA-Molekülen auf Oberflächen bezeichnet. Dabei erfolgt die Übertragung einer auf einem Stempel erzeugten DNA-Struktur auf eine definierte Oberfläche, z. B. eine gläserne Mikrostruktur mit Goldkontakten. Im Jahr 2003 von Nakao *et al.* [NAK 2] erstmals publiziert, könnte dieses Verfahren für Anwendungen in der Mikro- und Nanoelektronik besonders interessant werden, denn es sollte möglich sein, DNA direkt in mikroelektronische Schaltungen zu stempeln. An die Substratoberflächen werden keine besonderen Anforderungen gestellt. Aufgrund des Übertragungsmechanismus müssen sie aber hydrophiler als die Stempeloberfläche sein (siehe Kapitel 3). Im Vergleich mit anderen Methoden der Anbindung von DNA-Molekülen auf Oberflächen besitzt das *Transfer-Printing*-Verfahren eine Besonderheit: Es erfordert kein flüssiges Medium und ist deshalb mit vielen technologischen Schritten in der Mikroelektronik gut kombinierbar. Die Anordnung der DNA-Moleküle geschieht durch *Molecular-Combing*-Methoden (siehe Abschnitt 2.5.3) separat auf der Stempeloberfläche, erst danach werden die Moleküle auf das Substrat übertragen. Hier wird noch ein weiterer Vorzug des Verfahrens offenbar: Durch *Transfer Printing* ist es möglich, überstreckte DNA auch auf solchen Oberflächen zu immobilisieren, auf denen eine Adsorption durch *Molecular Combing* allein aufgrund von Oberflächeneigenschaften (z. B. starke Hydrophilie) nicht möglich wäre.

Im Unterschied zur lange bekannten Methode des *Microcontact Printing* bezeichnet das neue Verfahren *Transfer Printing* das Stempeln von langen, gestreckten oder überstreckten DNA-Molekülen. Als die Arbeitsgruppe um H. Nakao diese Idee veröffentlichte, konnte sie zeigen, dass das Verfahren erfolgreich und reproduzierbar funktioniert, aber der Mechanismus der Übertragung der DNA-Moleküle vom Stempel auf ein Substrat war noch nicht geklärt. Die Autoren beschreiben das *Transfer Printing* als eine einfache Methode, welche keine Oberflächenbehandlungen oder speziellen Geräte voraussetzt. In Abbildung 2.17 ist der Verfahrensablauf dargestellt. Als Stempel dient eine kleine Polymerplatte aus



PDMS, auf die ein Tropfen DNA-Lösung aufgesetzt wird. Während des anschließenden Absaugens des Tropfens werden die adsorbierten DNA-Moleküle durch die Bewegung des Flüssigkeitsmeniskus gestreckt. Im nächsten Schritt wird der PDMS-Stempel auf das Substrat, ein Deckglas oder ein Stück Glimmer, gedrückt und nach einer Zeitdauer von 5 Sekunden wieder abgehoben. Das Ergebnis ist die Übertragung nahezu aller Moleküle vom Stempel auf das Substrat.



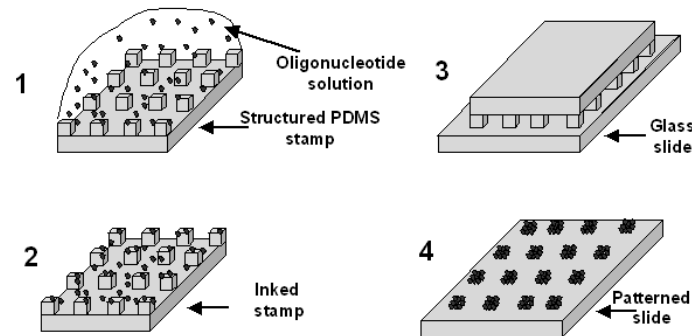
**Abb. 2.17:** Ablauf des *Transfer Printing*: Strecken der DNA-Moleküle auf dem PDMS-Stempel, Aufdrücken des Stempels auf ein Deckglas oder Glimmer und Abheben des Stempels [NAK 2].

*Transfer Printing* stellt eine Weiterentwicklung der Methode des *Microcontact Printing* dar, das 1993 von Whitesides *et al.* [WHI] am Beispiel der Strukturierung von Goldoberflächen mit Monolayern aus Thiolen vorgestellt wurde und sich in den letzten Jahren zu einer weit verbreiteten Technik zur schnellen und kostengünstigen Modifizierung und Mikrostrukturierung von Festkörperoberflächen entwickelt hat. So können z. B. Oberflächen mit einem alternierenden Muster aus hydrophoben und hydrophilen Bereichen erzeugt werden. Typischerweise werden elastische Stempel aus PDMS verwendet.

Die Vielfalt der Moleküle und Partikel, die gestempelt werden können, ist sehr groß. In der Literatur wird von DNA-Oligomeren, Proteinen, Lipidvesikeln, Polymeren und Kohlenstoffnanoröhren berichtet. Aber es handelt sich meist um kleine Moleküle und nicht, wie beim *Transfer Printing*, um bis zu 30 µm lange, ausgerichtete DNA-Stränge. Das einzelne Molekül spielt keine Rolle, sondern es kommt auf die Beschichtung einer durch die Strukturierung des Stempels vorgegebenen Fläche an. Der entscheidende Unterschied zwischen *Transfer* und *Microcontact Printing* besteht darin, dass beim *Transfer Printing* ein bereits auf dem Stempel erzeugtes Muster der Biomoleküle in kontrollierter Weise auf das Substrat übertragen wird, während beim *Microcontact*

*Printing* zwar der Stempel eine Strukturierung aufweisen kann, die Biomoleküle jedoch auf den Übertragungsflächen regellos aufgebracht sind.

Abbildung 2.18 zeigt das Prinzip des *Microcontact Printing* am Beispiel des Stempeln von DNA-Oligomeren auf Glas [THI] und demonstriert damit die Nutzbarkeit des Verfahrens für die Fertigung von Biochips.



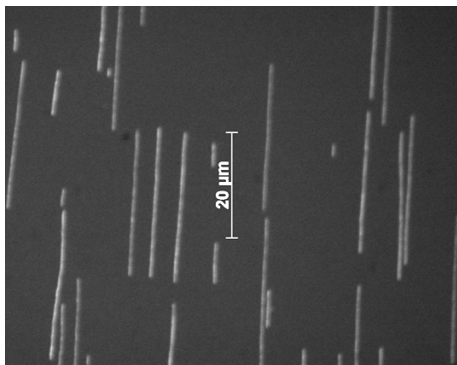
**Abb. 2.18:** Prinzip des *Microcontact Printing*: (1) Beladen des Stempels mit der "Stempelfarbe" (hier: Oligonukleotidlösung), (2) Trocknen des Stempels im Stickstoffstrom, (3) Aufsetzen des Stempels auf ein Glassubstrat, (4) Strukturierung der Glasoberfläche mit den gestempelten Oligonukleotiden, die Strukturierung korrespondiert mit der Struktur des Stempels [THI].

Biomoleküle auf einer Oberfläche immobilisieren zu können, spielt für viele Anwendungen eine große Rolle, so z. B. in der Biosensorik und bei anderen diagnostischen Methoden. Das Stempeln von Proteinen zeigt z.B. eine Arbeit von *Bernard et al.* [BER]. Hier werden viele verschiedene Proteine in einer definierten Anordnung auf eine Polystyrol-Oberfläche gestempelt. Auch vernetzte Lipidvesikel können mit Hilfe von PDMS-Stempeln auf Glassubstrate übertragen und damit möglicherweise in Sensoren und mikroelektronische Schaltungen integriert werden [MAH]. Ein weiterer Einsatz für das *Microcontact Printing* ist das Stempeln von dünnen, halbleitenden Polymeren zur Herstellung von Dünnschichttransistoren [SAL]. Bezüglich der gleichen Anwendung als Transistor gibt es Untersuchungen zum Stempeln von dünnen Filmen aus Kohlenstoffnanoröhren [MEI]. Hier können die einzelnen Röhrchen zwar einige Mikrometer lang sein, ihre Orientierung ist aber, anders als beim *Transfer Printing* von langen DNA-Molekülen, uneinheitlich.

### 3 Stempeln von DNA-Molekülen

Dieses Kapitel beschäftigt sich mit der Methode des Stempelns von DNA-Molekülen. Mit diesem neuartigen Druckverfahren werden gestreckte DNA-Moleküle auf eine Oberfläche übertragen. Damit ist es möglich, DNA-Netzwerke kontrolliert aufzubauen und in mikroelektronische Kontaktstrukturen zu integrieren.

Abbildung 3.1 zeigt als Beispiel eine lichtmikroskopische Aufnahme von fluoreszenzmarkierter  $\lambda$ -DNA, die auf eine Glasoberfläche gestempelt wurde, nachdem die Moleküle auf einem PDMS-Stempel gestreckt und parallel angeordnet wurden.



**Abb. 3.1:** Parallele Anordnung von  $\lambda$ -DNA-Molekülen, überstreckt und auf eine Glasoberfläche gestempelt. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme.

In dem folgenden Kapitel werden die beiden Phasen des Stempelprozesses „Beladen des Stempels“ durch *Molecular Combing* und „Transfer der Moleküle auf das Substrat“ durch *Transfer Printing* untersucht. Ausgehend vom bekannten wissenschaftlichen Stand der Methode des *Molecular Combing* und dem erarbeiteten Modell zur Beschreibung der Wechselwirkungen zwischen DNA, Flüssigkeitsmeniskus und Oberfläche (Kapitel 2.5.3) wird hier die Anwendung des Verfahrens auf PDMS-Oberflächen bei Variation verschiedener experimenteller Parameter diskutiert. Die nachfolgenden Abschnitte beschäftigen sich mit dem Verfahren des *Transfer Printing* von DNA, das bereits in Abschnitt 2.5.4 als eine Weiterentwicklung des *Microcontact Printing* vorgestellt wurde. Der Schwerpunkt liegt auf der Aufklärung des Transfermechanismus. Eine erste technische Anwendung stellt der Transfer von DNA-Molekülen in eine Struktur mit Goldkontakten dar. Dieses ist durch die Verwendung von strukturierten Stempeln und der exakten Positionierung von Stempel und Substrat erreichbar.

Eine Darstellung des experimentellen Vorgehens beim Stempeln und die Charakterisierung der Stempel- und Substratoberflächen sind diesem Kapitel vorangestellt.

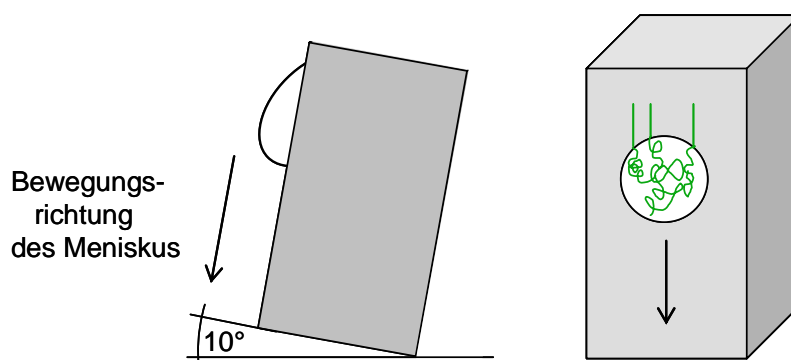
### 3.1 Experimentelles Vorgehen

Stempel wurden entsprechend der Herstellervorschrift aus Polydimethylsiloxan (PDMS) gegossen (siehe Anlage A1). Aus einer Platte wurden anschließend quaderförmige Stempel von ca.  $2 \cdot 2 \cdot 4 \text{ mm}^3$  mit einem Skalpell herausgetrennt. Zum Stempeln wurde stets die Quaderfläche verwendet, die bei der Polymervernetzung die Grenzfläche zur Luft bildete. So war gewährleistet, dass alle Stempel vergleichbare Oberflächen hatten.

Als Substrate dienten Deckgläschen mit Dicken zwischen 90 und 180  $\mu\text{m}$ , die vor der Verwendung mit rauchender Salpetersäure und Natronlauge gereinigt wurden (siehe Anlage A2).

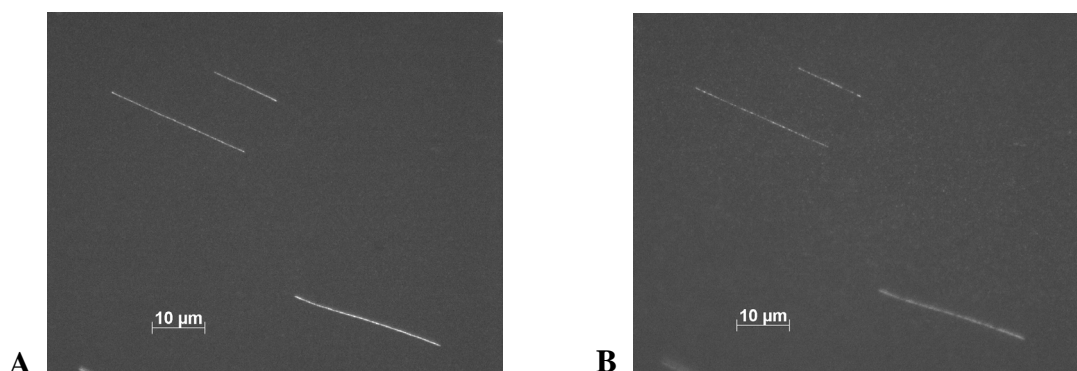
„Stempelfarbe“ ist die DNA-Lösung. Sie besteht aus Tris/EDTA-Puffer (10 mM/1 mM, pH 8) und enthält  $\lambda$ -DNA in einer Konzentration von 28 ng/ $\mu\text{l}$ . Die DNA wurde mit dem Fluoreszenzmarker YOYO-1 mit der geringen Markierungsrate von 0,05 (YOYO-1/Basenpaar-Verhältnis von 1: 20) markiert.

Den ersten Teil des Stempelprozesses bildete das Beladen ("Färben") des Stempels. Der Stempel wurde leicht gekippt, sodass die Stempelfläche im Vergleich zur Senkrechten um  $10^\circ$  geneigt war. 25  $\mu\text{l}$  der DNA-Lösung wurden als ein Tropfen an der oberen Kante der zu beladenden Stempelfläche abgesetzt. Infolge der Schwerkraft rollte der Tropfen die geneigte Ebene hinab. Währenddessen adsorbierten die DNA-Moleküle auf der hydrophoben PDMS-Oberfläche und wurden durch die Kraft des sich bewegenden Flüssigkeitsmeniskus gestreckt (Abbildung 3.2).



**Abb. 3.2:** Beladen des PDMS-Stempels mit DNA-Molekülen durch *Molecular Combing*: Ein Tropfen DNA-Lösung rollt über die Oberfläche, die Moleküle adsorbieren und werden durch die Kraftwirkung des die Oberfläche überstreichenden Flüssigkeitsmeniskus gestreckt.

Den zweiten Teil des Prozesses bildete das eigentliche Übertragen der Moleküle auf das Substrat. Hierzu wurde der Stempel mit einer Pinzette auf das Deckgläschen aufgesetzt, leicht angedrückt und nach etwa 3 s wieder abgehoben. Im Ergebnis wurden alle auf dem Stempel adsorbierten Moleküle auf das Glas übertragen. Auf dem PDMS-Stempel konnten nach dem Stempeln keine Moleküle mehr gefunden werden. Abbildung 3.3 demonstriert diese hohe Übertragungsrate, hier ist eine Abbildung des beladenen Stempels einer Aufnahme des Glases nach dem Abnehmen des Stempels gegenübergestellt.



**Abb. 3.3:** Nachweis der vollständigen Übertragung der DNA-Moleküle von der PDMS- auf die Glasoberfläche. Abbildung der gleichen Probenstelle bei aufliegendem Stempel (**A**) und nach Entfernung desselben (**B**). Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme durch das Glassubstrat hindurch. Die Kontrastabnahme in Teilbild B resultiert aus der wiederholten Belichtung der fluoreszenzmarkierten Moleküle bei der Aufnahme der Bilder.

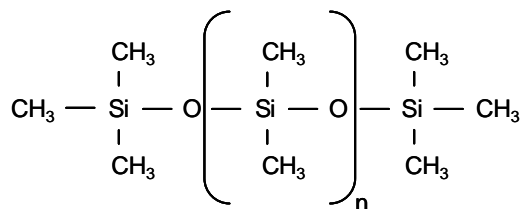
Die Auswertung der Stempelexperimente erfolgte mit Hilfe eines inversen Fluoreszenzmikroskops mit einem 100 x 1,4 Ölimmersionsobjektiv. Die DNA-Moleküle konnten so bei aufliegendem und bei abgenommenem Stempel von unten durch das Glassubstrat betrachtet werden.

Jede Aufnahme stellt einen ganz typischen, aber willkürlich ausgewählten Ausschnitt der Probenfläche dar.

### 3.2 Charakterisierung der Oberflächen

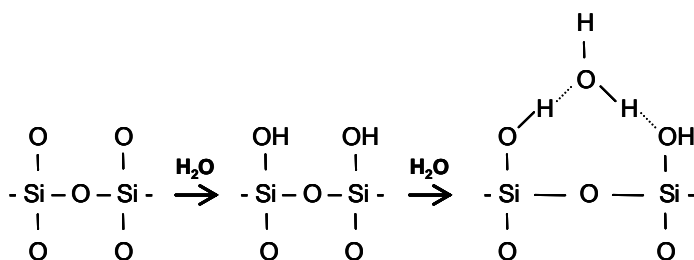
Polydimethylsiloxan ( $(\text{C}_2\text{H}_6\text{OSi})_n$ , PDMS) ist ein weiches, durchsichtiges Polymer aus der Familie der Siloxane mit einer amorphen Struktur. Das Silikongerüst des Makromoleküls enthält alternierend Si- und O-Atome, an den Si-Atomen sind jeweils zwei Methylgruppen gebunden (Abbildung 3.4). Die Kettenlängen können variieren. Für die Nutzung von PDMS beim Stempeln von Biomolekülen ist die glatte und stark hydrophobe Oberfläche

wichtig. Die Hydrophobie resultiert aus der symmetrischen Anordnung der unpolaren Methylgruppen.



**Abb. 3.4:** Polydimethylsiloxan: Symmetrische Anordnung unpolarer Methylgruppen am Si-O-Gerüst.

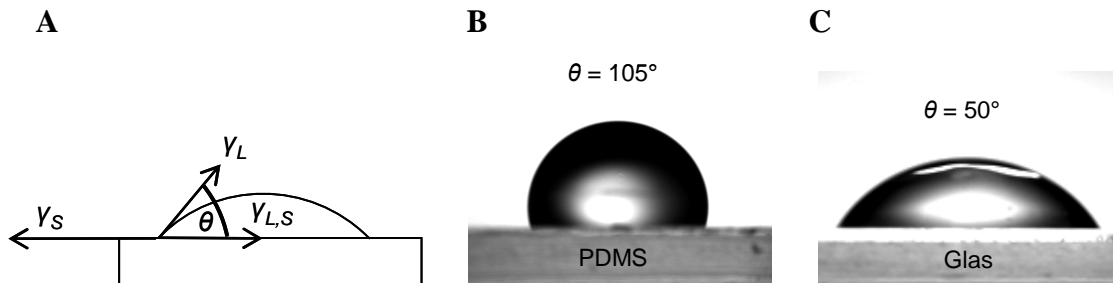
Beim Substratmaterial Silikatglas besitzt die Festkörperoberfläche nichtabgesättigte freie Bindungen, sodass es zur Adsorption von Gas- oder Flüssigkeitsmolekülen (z. B.  $\text{H}_2\text{O}$ ) aus der Umgebung kommt. Außerdem kann bei Silikaten eine echte chemische Reaktion unter Bildung von OH-Gruppen stattfinden, ein mögliches Reaktionsschema ist in Abbildung 3.5 dargestellt. Bei Raumtemperatur befindet sich auf der Glasoberfläche eine einige Nanometer dicke Wasserschicht, die polare Glasoberfläche verhält sich hydrophil. Auf Quarzglas wurden 5 bis 10 Hydroxylgruppen pro  $\text{nm}^2$  gemessen, die Anzahl nimmt mit steigender Temperatur ab [PEZ].



**Abb. 3.5:** Hydratation der Glasoberfläche unter Bildung von Hydroxylgruppen [PEZ].

Um die Hydrophilie von PDMS- und Glasoberfläche vergleichen zu können, wurden die Kontaktwinkel aufgesetzter Wassertropfen bestimmt. Dieser Winkel ist ein Maß für die energetischen Wechselwirkungen zwischen Flüssigkeit und Festkörper. Er wird ermittelt, indem an dem Punkt, wo die Projektion des Flüssigkeitstropfens die Festkörperoberfläche und die Umgebungsphase berührt, eine Tangente angelegt und der Winkel  $\theta$  abgelesen wird (siehe Abbildung 3.6 A). Den Zusammenhang zwischen dem Kontaktwinkel  $\theta$  und den Oberflächen- bzw. Grenzflächenspannungen zeigt die *Young'sche* Gleichung (3.1). Dabei wird mit  $\gamma_s$  die Oberflächenspannung der Festkörperoberfläche, mit  $\gamma_{L,S}$  die Grenzflächenspannung zwischen fester und flüssiger Phase und mit  $\gamma_L$  die Oberflächenspannung der Flüssigkeit bezeichnet. Es ist ersichtlich, dass eine erhöhte Grenzflächenspannung zwischen Flüssigkeit und Festkörper, eine Verringerung der Oberflächenspannung der Festkörperoberfläche und auch eine Erhöhung der Oberflächenspannung der Flüssigkeit zu einer Zunahme des Kontaktwinkels  $\theta$  führen:

$$\cos \theta = \frac{\gamma_s - \gamma_{L,S}}{\gamma_L} \quad (3.1)$$



**Abb. 3.6:** Bestimmung der Kontaktwinkel zum Vergleich der Hydrophilie von PDMS- und Glasoberfläche.

A) Prinzipskizze zum Ablesen des Winkels.

B) Kontaktwinkel des Wassertropfens auf einer PDMS-Oberfläche beträgt  $\theta = 105^\circ$ , Oberfläche ist hydrophob.

C) Kontaktwinkel des Wassertropfens auf einer Glasoberfläche beträgt  $\theta = 50^\circ$ , Oberfläche ist hydrophiler.

Wie zu erwarten war, unterscheiden sich die beiden Tropfenbilder deutlich voneinander. Kontaktwinkel von über  $100^\circ$  bestätigen die starke Hydrophobie der PDMS-Oberfläche, die Oberflächen der gereinigten Deckgläschen sind mit Kontaktwinkeln von ca.  $50^\circ$  wesentlich hydrophiler. Diese Oberflächeneigenschaften sind von essentieller Bedeutung für einen erfolgreichen Stempelprozess.

### 3.3 Beladen des Stempels durch *Molecular Combing*

Die Methode des *Molecular Combing* wurde genutzt, um die PDMS-Stempel mit DNA-Molekülen zu beladen. Zu den Faktoren, die die chemischen und mechanischen Eigenschaften von DNA und damit die Adsorption der Moleküle auf dem Stempel beeinflussen, gehören der pH-Wert und die Salzkonzentration der verwendeten Pufferlösung. Ihr Einfluss auf die Adsorption der DNA wird in den folgenden Abschnitten untersucht.

### 3.3.1 DNA-Adsorption in Abhängigkeit vom pH-Wert

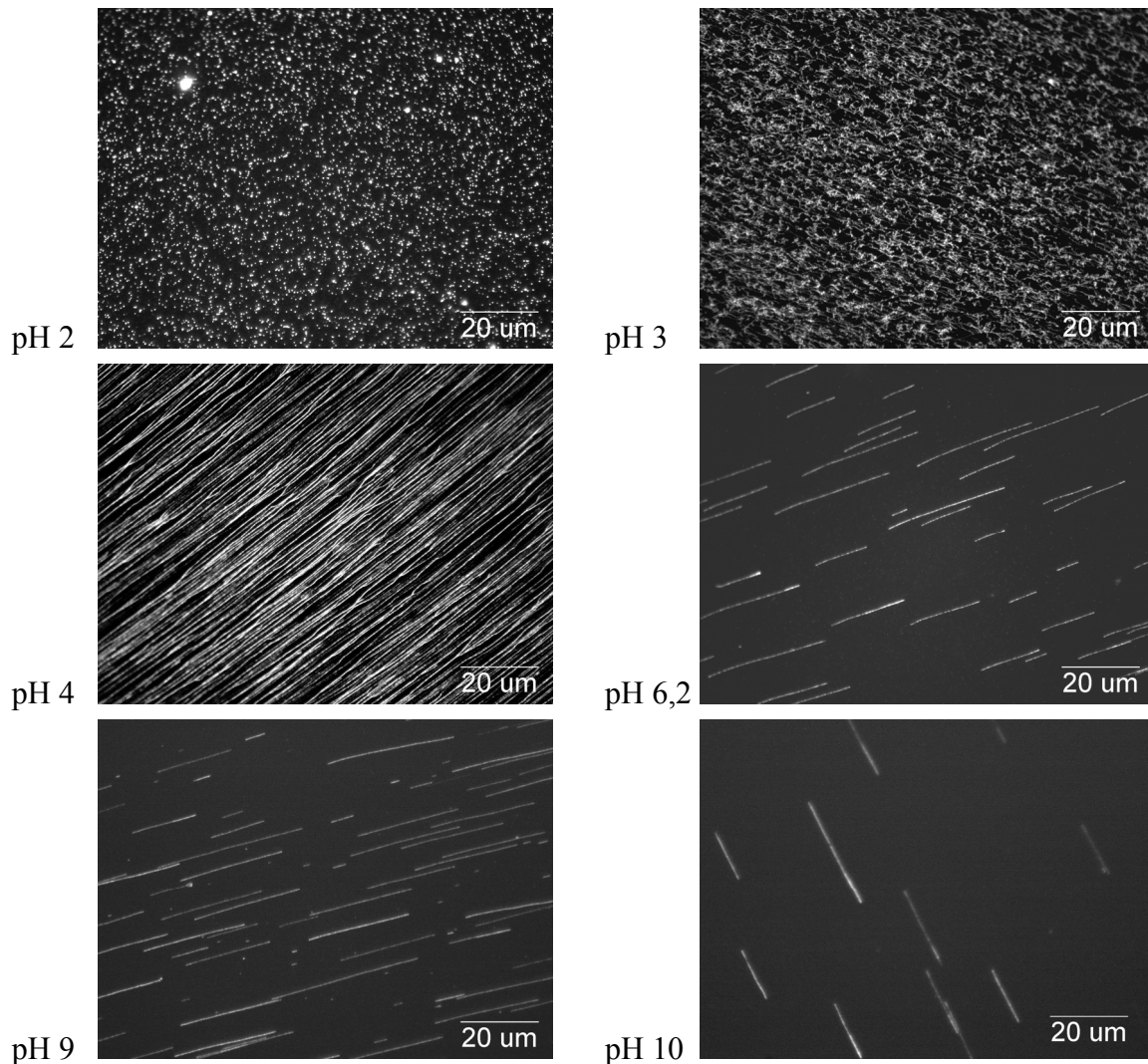
Der pH-Wert einer DNA-Lösung beeinflusst die Stabilität und das Aufschmelzen der Moleküle und damit deren Fähigkeit zur Adsorption. In der Literatur wird diskutiert, dass es, unabhängig von der Hydrophilie der Oberfläche, nur einen schmalen pH-Bereich gibt, innerhalb dessen DNA-Moleküle stark und endspezifisch adsorbieren können. Für spätere technische Anwendungen des Stempelns, z. B. die Übertragung angebundener Nanoobjekte, ist es aber notwendig, größere Variationsmöglichkeiten hinsichtlich pH zu haben. Außerdem wurde die pH-Abhängigkeit der Adsorption auf PDMS-Oberflächen bisher noch nicht analysiert.

Aus diesen Gründen wurden Adsorptionuntersuchungen von  $\lambda$ -DNA-Molekülen auf PDMS in einem pH-Bereich von 2 bis 10 vorgenommen. Dazu wurden Pufferlösungen verschiedener pH-Werte, wie in Tabelle 3.1 charakterisiert, angesetzt. Das Herstellen der DNA-Lösungen und das Auskämmen der Moleküle mit der „Methode des rollenden Tropfens“ erfolgten analog der Beschreibung in Abschnitt 3.1 für alle Proben in gleicher Weise.

pH-Bereich	Puffersubstanz
2,0 - 4,0	<b>Citratpuffer</b> nach Sørensen [RAU]: 100 mM Zitronensäure-Monohydrat $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ und 1 M NaOH, pH-Einstellung mit HCl
4,5 - 6,2	<b>MES</b> : 50 mM Morpholinoethansulfonsäure $C_6H_{13}NO_4S \cdot H_2O$ , pH-Einstellung mit HCl oder NaOH
6,9 - 9,0	<b>Tris/EDTA</b> : 10 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan $C_4H_{11}NO_3$ / 1 mM Ethylendiamintetraessigsäure $C_{10}H_{16}N_2O_8$ , pH-Einstellung mit HCl oder NaOH
9,7 - 10	<b>AMPSO</b> : 10 mM N-(1,1-Dimethyl-2-hydroxyethyl)-3-amino-2-hydroxypropanesulfonsäure $C_7H_{17}NO_5S$ , pH-Einstellung mit NaOH

**Tabelle 3.1:** Pufferlösungen, die in den verschiedenen pH-Bereichen verwendet wurden, um die pH-Abhängigkeit der DNA-Adsorption auf PDMS zu untersuchen.





**Abb. 3.7:** Adsorption von  $\lambda$ -DNA-Molekülen auf PDMS in Abhängigkeit vom pH-Wert. Im gesamten pH-Bereich zwischen 4 und 10 adsorbieren die Moleküle gestreckt und in großer Anzahl, wobei bei pH 4 stets eine besonders hohe Belegungsichte auftritt. Bei pH-Werten unterhalb von 4 ist die Adsorption so stark, dass die Moleküle nicht gestreckt werden können.

Eine Übersicht der Ergebnisse der *Molecular-Combing*-Experimente zeigt die Abbildung 3.7. Nach Adsorption im sehr sauren Milieu bei pH 2 waren die DNA-Moleküle nur als helle Spots zu sehen. Die sehr starke und unspezifische Adsorption ließ keine Streckung zu, die Moleküle adsorbierten in Knäuelkonformation.

Bei pH 3 war zwar die Richtung der Meniskusbewegung zu erkennen, aber auch hier war die Adsorption so stark, dass die Moleküle nicht ausgestreckt werden konnten.

Bei pH 4 änderte sich das Erscheinungsbild der adsorbierten DNA, es traten eine starke Streckung und eine hohe Belegungsichte auf. Diese große Moleküldichte wurde immer nur bei pH 4 erreicht. Außerdem fiel auf, dass Anfang und Ende der einzelnen Moleküle nicht auszumachen sind, sie scheinen miteinander verkettet zu sein.

Bei pH-Werten zwischen 5 und 9 wurde bei allen Proben ein vergleichbares Adsorptionsverhalten beobachtet. Es kam zur starken und endspezifischen Adsorption und die Moleküle wurden stark überstreckt, teilweise auf bis zu 200 % ihrer Konturlänge.

Auch bei pH 10 wurden diese Ergebnisse beobachtet, allerdings war die Belegungsdichte der Moleküle wieder etwas geringer. Im Gegensatz zur Literatur [ALL], in der auf hydrophoben Oberflächen die höchste Adsorptionsrate bei einem pH-Wert von 5,5 erreicht wurde, konnte gezeigt werden, dass optimale Bedingungen für starke und gleichzeitig endspezifische Adsorption von DNA-Molekülen nicht nur bei einem bestimmten pH-Wert, sondern in einem breiten pH-Bereich zwischen 4 und 10 gegeben sind.

### 3.3.2 DNA-Adsorption in Abhängigkeit von der NaCl-Molarität im Puffer

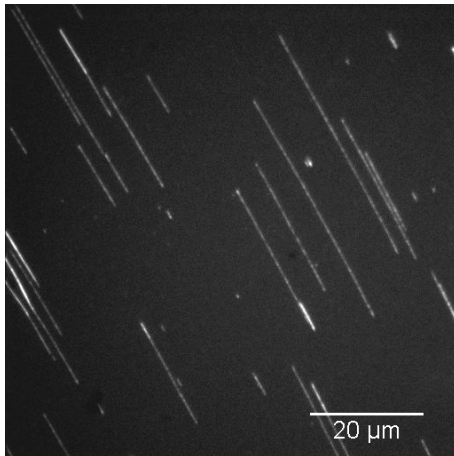
Aus der Literatur ist bekannt, dass die Salzkonzentration einer Lösung Einfluss auf wesentliche Parameter für das *Molecular Combing* nimmt. So wird das Aufschmelzverhalten von DNA-Molekülen beeinflusst, eine Erhöhung der Salzkonzentration führt wegen der Ladungsabschirmung des geladenen DNA-Rückgrates zu einem Ansteigen der Schmelztemperatur [BAL]. Ladungsabschirmung ist auch die Ursache für die Variation der elastischen Eigenschaften von DNA. Eine Erhöhung der Ionenkonzentration an einwertigen Ionen bedingt eine größere Kraft, die zum Überstrecken eines Moleküls notwendig ist [BAU].

Um zu untersuchen, in welcher Weise die Konzentration an NaCl das Adsorptionsverhalten von DNA auf PDMS beeinflusst, wurden *Molecular-Combing*-Experimente mit  $\lambda$ -DNA-Lösungen durchgeführt, die entweder kein NaCl oder NaCl in Konzentrationen von 1; 10; 100 und 1000 mM enthielten. Dazu wurden Tris/EDTA-Pufferlösungen (10 mM/1 mM, pH 8) mit Na-freiem EDTA hergestellt und die entsprechenden NaCl-Mengen zugegeben. Gemäß den Angaben in Abschnitt 3.1 enthielten die DNA-Lösungen  $\lambda$ -DNA in der Konzentration von 28 ng/ $\mu$ l und Fluoreszenzmarker YOYO-1 für eine Markierungsrate von 0,05. Das Auskämmen der Moleküle erfolgte ebenfalls bei allen Proben analog der Beschreibung in Kapitel 3.1.

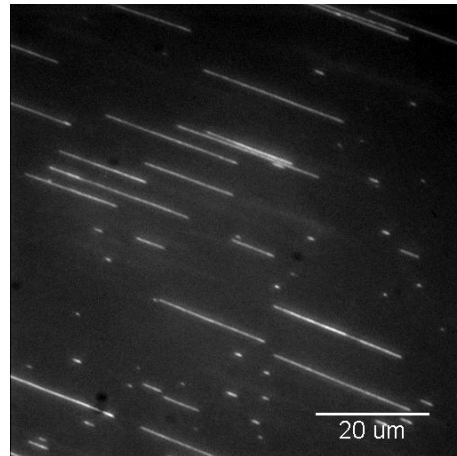
Typische Ergebnisse der DNA-Adsorption sind in Abbildung 3.8 dargestellt. Unabhängig von der NaCl-Konzentration wurden die Moleküle stets gestreckt und überstreckt. Bei Versuchen ohne NaCl konnte die „übliche“ Belegungsdichte, wie sie bei pH-Werten zwischen 6 und 9 auftrat, erreicht werden.

Die Zugabe von NaCl in die DNA-Lösung führte ab einer Konzentration von 10 mM zu einer Erhöhung der Anzahl an adsorbierten Molekülen, wobei bei 100 mM NaCl stets die

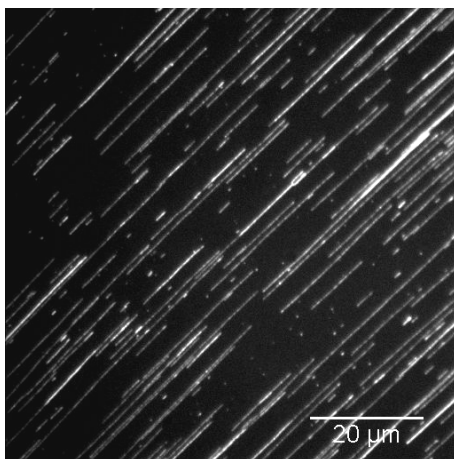
höchste Adsorptionsrate auftrat. Die Versuchsergebnisse ähnelten hier denen bei pH 4, sie zeigten eine sehr hohe Belegungsichte an DNA, sodass die Molekülen nicht auszumachen waren. Bei weiterer Erhöhung der Salzkonzentration auf 1000 mM NaCl wurde die Belegungsichte wieder geringer.



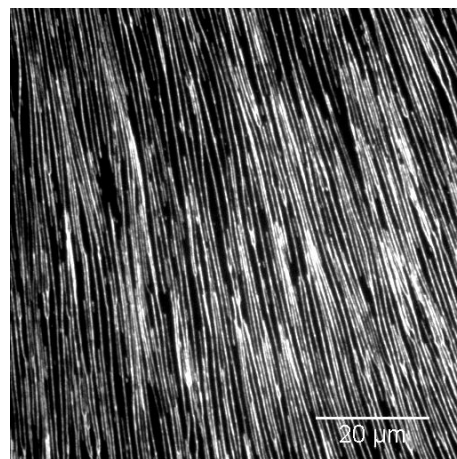
0 mM NaCl



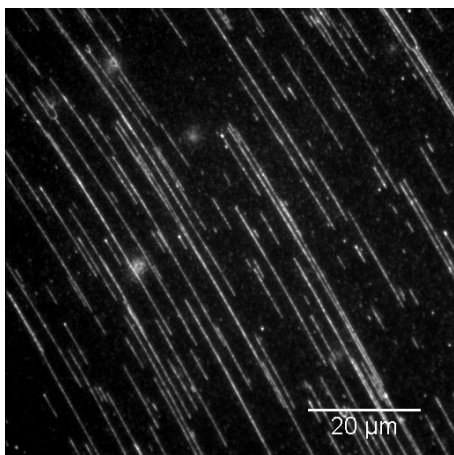
1 mM NaCl



10 mM NaCl



100 mM NaCl



1000 mM NaCl

**Abb. 3.8:** Adsorption von  $\lambda$ -DNA-Molekülen auf PDMS in Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration im Puffer.

Ab einer Konzentration von 10 mM NaCl tritt eine deutliche Erhöhung der Belegungsichte an Molekülen auf, die bei 100 mM NaCl ein Maximum durchläuft.



### 3.3.3 *Molecular Combing* von Plasmid-DNA

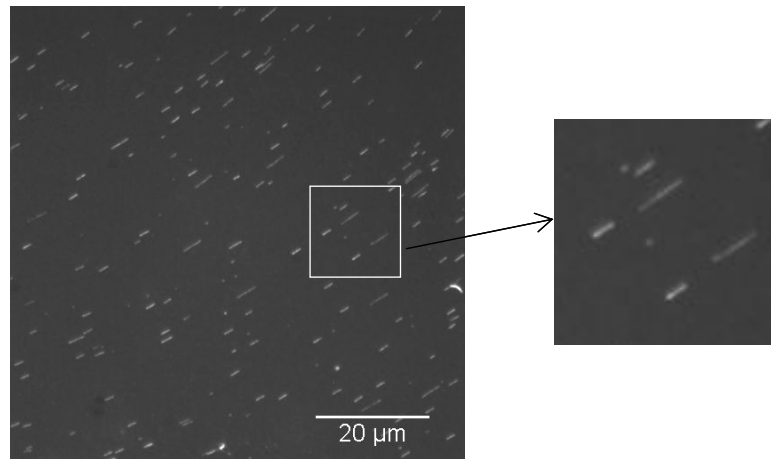
Der Adsorptionsmechanismus für DNA-Moleküle auf hydrophoben Oberflächen, der von *Allemand et al.* [ALL] vermutet und diskutiert wird, beruht auf hydrophoben Wechselwirkungen. Dafür muss der hydrophobe Kern der DNA zur Adsorption auf der Oberfläche zur Verfügung stehen, also nach außen gekehrt sein. Das setzt voraus, dass der Doppelstrang zumindest teilweise aufgeschmolzen vorliegt. Dieses gilt insbesondere für die Strangenden, denn dort beginnt, wie in den bisherigen experimentellen Ergebnissen zu sehen ist, die Adsorption. Besitzt die DNA *sticky ends*, so sind damit einsträngige Bereiche für die endspezifische Adsorption vorhanden. Ohne *sticky ends* stellen die Molekülenden aufgrund der fehlenden Nachbarbasenpaare die Startpunkte für das Aufschmelzen und die Oberflächenadsorption dar. Wie kann aber die Adsorption erfolgen, wenn die DNA-Moleküle weder *sticky ends* noch *blunt ends* haben? Das in Abschnitt 2.5.3 erarbeitete Modell zur Adsorption der Moleküle auf hydrophoben Oberflächen sagt voraus, dass kleinste zufällig aufgetrennte Bereiche von lediglich zwei Basenpaaren ausreichen sollten, um die Adsorption einzuleiten.

Um diese These zu prüfen, wurde versucht, Plasmide mittels *Molecular Combing* auf einer PDMS-Oberfläche adsorbieren zu lassen.

Es wurde das nicht linearisierte Plasmid pWH 1014/2c verwendet. Es besitzt 7219 Basenpaare, das entspricht einer Konturlänge des Ringes von ca. 2,4 µm. Die Versuchsbedingungen wurden analog der Beschreibung in Abschnitt 3.1 gestaltet, als Puffer diente wiederum Tris/EDTA mit pH 8.

Abbildung 3.9 zeigt eine typische Fluoreszenzaufnahme von auf PDMS adsorbierten und gestreckten Plasmiden. Es ist zu sehen, dass auch ringförmige DNA-Moleküle, die keinen für den Start des Aufschmelzens bevorzugten Ort haben, auf der hydrophoben PDMS-Oberfläche adsorbieren können. Die geschlossenen Plasmide sind in der Aufnahme als kurze, helle Striche zu sehen. Bei den doppelt so langen und nicht so hell leuchtenden Molekülen handelt es sich um aufgebrochene Plasmide. Im kleinen Bildausschnitt werden die Längen- und Helligkeitsunterschiede deutlich. Eine quantitative Auswertung der Abbildung ergab, dass der größte Teil (hier: 111 von 129 Molekülen, 86 %) der enthaltenen Moleküle als Ring auf der Oberfläche adsorbierte. Die linearisierten Moleküle müssen schon in Lösung in diesem Zustand vorgelegen haben, denn die Adsorption begann an einem Molekülende. Durch Ausmessen der Moleküllängen wurde ermittelt, dass sowohl die geschlossenen als auch die aufgebrochenen Moleküle auf über 150 % ihrer Konturlängen gestreckt worden sind. Bei den geschlossenen Plasmiden änderte sich die Länge von  $2 \cdot 1,2 \pm 0,32$  µm auf  $2 \cdot 1,85 \pm 0,32$  µm und bei den offenen Plasmiden von  $2,4 \pm 0,32$  µm auf  $3,7 \pm 0,32$  µm. Der angegebene Messfehler setzt sich aus zwei Anteilen zusammen, ein Anteil resultiert aus dem Auflösungsvermögen des Mikroskopes *d*

( $d = \lambda_L / (2 \cdot NA) = 491 \text{ nm} / (2 \cdot 1,4) = 175,3 \text{ nm}$ ), der andere aus der Pixelgröße auf dem Bild (ca. 150 nm). Die Anregungswellenlänge  $\lambda_L$  für den Fluoreszenzmarker YOYO-1 beträgt 491 nm, die numerische Apertur des Objektivs 1,4.



**Abb. 3.9:** Durch *Molecular Combing* auf PDMS adsorbierte Plasmide pWH 1014/2c. 86 % aller Moleküle adsorbieren als geschlossener Ring. Damit wird gezeigt, dass die Adsorption auch bei solchen DNA-Molekülen möglich ist, die keinen bevorzugten Ort für das Aufschmelzen des Doppelstranges haben. Geschlossene und aufgebrochene Plasmide unterscheiden sich deutlich in Moleküllänge und Helligkeit der Fluoreszenz (kleines Bild).

### 3.3.4 Diskussion der Ergebnisse

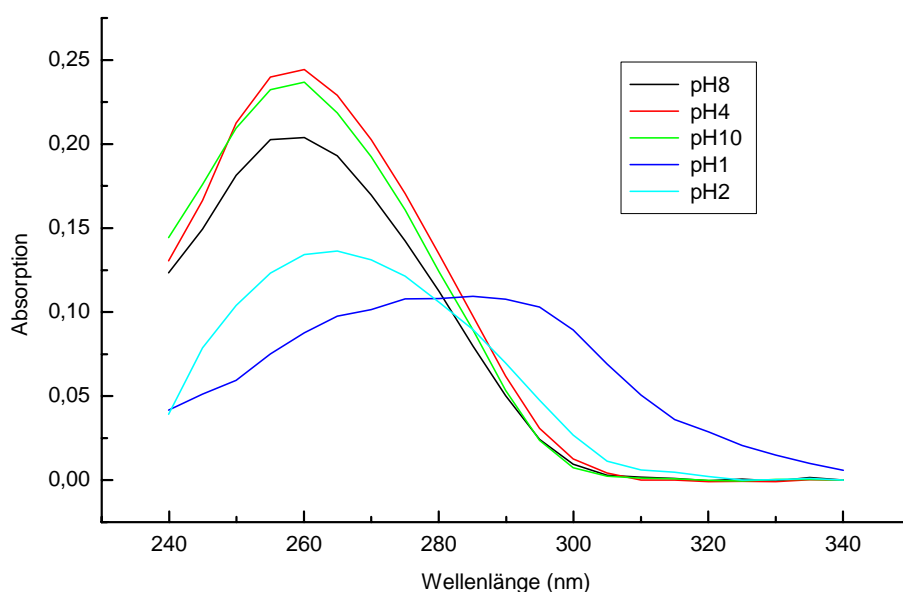
Die experimentellen Ergebnisse demonstrieren, dass die Methode des *Molecular Combing* in einem weiten Variationsbereich von Versuchsbedingungen geeignet ist, um DNA-Moleküle auf einer Oberfläche gestreckt zu immobilisieren.

Der Grund, warum DNA-Moleküle infolge des *Molecular Combing* an einer hydrophoben Oberfläche binden, ist in der Literatur Gegenstand der Diskussion. Wie bereits in Abschnitt 2.5.3 erläutert, wird vermutet, dass die Adsorption aufgrund hydrophober Wechselwirkungen zwischen der Oberfläche und dem hydrophoben DNA-Kern infolge pH-induzierten Aufschmelzens von Molekülen zustande kommt [ALL]. Hydrophobe Wechselwirkungen sind keine anziehenden Wechselwirkungen zwischen dem unpolaren DNA-Kern und der unpolaren PDMS-Oberfläche, sondern die Anziehung rührt vom Bestreben des Wassers her, den Kontakt mit ihnen zu minimieren. Sie sind eine Folge der starken Wechselwirkung aufgrund von Wasserstoffbrücken zwischen den Wassermolekülen [KEP].

### Variation des pH-Wertes

Der pH-Wert der Lösung beeinflusst durch sein Wirken auf den Denaturierungszustand der DNA sowohl die Adsorptionsrate als auch die Länge der adsorbierten Moleküle.

In pH-Bereichen, die außerhalb des physiologischen Bereiches (von 5 bis 9) liegen, werden Stickstoffatome der DNA-Basen protoniert oder deprotoniert. Dadurch werden Wasserstoffbrückenbindungen aufgelöst und der Doppelstrang stellenweise aufgeschmolzen. Um eine Vorstellung zu erhalten, zu welchem Grad ein DNA-Doppelstrang bei welchem pH-Wert denaturiert vorliegt, wurden  $\lambda$ -DNA-Moleküle in Lösungen mit verschiedenen pH-Werten (siehe Tabelle 3.1) spektrometrisch untersucht. In Abbildung 3.10 ist das entsprechende Absorptionsspektrum dargestellt.



**Abb. 3.10:** Absorptionsspektren von  $\lambda$ -DNA bei verschiedenen pH-Werten. Im Vergleich zur Absorption im physiologischen Bereich bei pH 8 kommt es im sauren und basischen Bereich (pH 4 und 10) aufgrund von Protonierungen und Deprotonierungen der Basen zur Hyperchromizität, was eine teilweise Denaturierung der Moleküle anzeigt. Im stark sauren Milieu (pH 1 und 2) verschwinden die typischen Absorptionsmaxima der Basen, es können Apurin-Stellen entstehen, an denen die Basen fehlen.

Ausgehend von der Absorptionslinie im physiologischen Bereich bei pH 8 (schwarz) ist eine deutliche Erhöhung des Absorptionsmaximums bei 260 nm bei den pH-Werten 4 und 10 (rot und grün) zu erkennen. Diese Hyperchromizität bestätigt eine Protonierung bzw. Deprotonierung der Basen und das damit verbundene teilweise Auftrennen des Doppelstranges und wurde so erwartet (siehe Abschnitt 2.3). Beide Spektren liegen nahe beieinander, es wird ein vergleichbarer Denaturierungszustand der DNA vorliegen. Bei pH-Werten im stark sauren Bereich von 1 und 2 wird die Absorption deutlich geringer, die Peaks werden breiter und die Maxima verschieben sich zu größeren Wellenlängen hin

(hell- und dunkelblau). Das Verschwinden des typischen Absorptionsmaximums der DNA-Basen bei 260 nm spricht für ein Auflösen der Basen unter diesen extremen Bedingungen. Es ist bekannt, dass im sehr stark sauren Milieu Protonierungen auftreten, die zur Aufspaltung der glycosidischen Bindungen zwischen den Purinbasen und den Zuckerresten führen (Apurin-Stellen). Es bleibt nur das Phosphatrückgrat erhalten, die Basen fehlen stellenweise permanent [KNI 1].

Mit diesen Kenntnissen können nun die mittels *Molecular Combing* bei verschiedenen pH-Werten adsorbierten Moleküle in Abbildung 3.7 betrachtet werden.

Im extrem sauren Milieu bei **pH 2** erscheinen als Ergebnis der Adsorption lediglich „Punkte“. Es ist wahrscheinlich, dass es sich dabei nur um adsorbierte Teilstücke von DNA-Molekülen handelt, weil die  $\lambda$ -DNA-Moleküle nicht mehr intakt sind. Diese Annahme beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums von 260 nm zu größeren Werten hin, die auf strukturelle Veränderungen der Moleküle bei diesem pH-Wert hinweist.

Bei beiden **pH-Werten 2 und 3** erfolgt die Adsorption der DNA im geknäuelten Zustand. Durch die starke Denaturierung der Moleküle ist deren Oberfläche so stark hydrophob, dass es zu einer starken Adsorption am hydrophoben Substrat bereits im Tropfen kommt. Sie ist so stark, dass die Moleküle nicht endspezifisch, sondern sofort mit ihrer gesamten Länge am Substrat adsorbieren. Die Kraft des Flüssigkeitsmeniskus reicht hier zum Strecken der Moleküle nicht aus.

Bei **pH 4** ändert sich das Erscheinungsbild der adsorbierten Moleküle drastisch, ab diesem pH-Wert ist die Adsorption endspezifisch, die DNA wird gestreckt und stark überstreckt. Die Adsorptionsrate der Moleküle ist so hoch, dass es kaum möglich ist, Einzelmoleküle auszumachen. Diese hohe Adsorptionsrate kann möglicherweise in der „Verlängerung“ der *sticky ends* durch die starke Denaturierung begründet sein, wodurch sich die Wahrscheinlichkeit einer zufälligen, endspezifischen Adsorption erhöht. Da pH 4 außerhalb des für DNA physiologischen Bereiches liegt, wird das Molekül hier, an den DNA-Enden beginnend, denaturiert. Die Moleküloberfläche wird dadurch hydrophober, sodass sich die Moleküle leicht aus der Flüssigkeit herausziehen lassen. Damit kann das extreme Überstrecken der Moleküle erklärt werden. Es reicht eine vergleichsweise geringe Meniskuskraft  $F_M$  zum Überstrecken aus. Betrachtet man die Bedingung  $F_A \geq F_M$  in Gleichung (2.8), wird ersichtlich, dass auch die Adsorptionskraft  $F_A$  nicht übermäßig groß sein muss, damit die Moleküle adsorbieren und nicht mit dem Meniskus mitgezogen werden.

Im physiologischen **pH-Bereich zwischen 5 und 9** weisen die *Molecular-Combing*-Experimente einander ähnliche Ergebnisse auf. Es liegen endspezifisch adsorbierte, stark überstreckte Einzelmoleküle mit mittlerer Adsorptionsrate vor. Die DNA-Basen sind hier in Wesentlichen nicht protoniert oder deprotoniert. Zufällige Denaturierungen treten aufgrund fehlender Nachbarbasen bevorzugt an den Molekülenden auf. Die

Moleküloberflächen sind im physiologischen pH-Bereich hydrophiler als im denaturierten Zustand außerhalb dieses Bereiches. Das bedeutet, dass zum Strecken der Moleküle eine größere Kraft  $F_M$  benötigt wird als z. B. bei pH 4.

Bei **pH 10** sollte der Denaturierungszustand der DNA aufgrund der Deprotonierung von Basen und dem damit verbundenen Wegfallen von Wasserstoffbrücken ähnlich dem von pH 4 sein. Trotzdem wurde bei den Experimenten keine Erhöhung der Adsorptionsneigung festgestellt, sondern eher eine etwas verringerte Belegungsdichte beobachtet. Ein Erklärungsversuch dieses Phänomens mit der Erhöhung der Kationenkonzentration in der Lösung infolge der Feineinstellung des pH-Wertes mit NaOH und der daraus resultierenden verringerten Denaturierung der DNA steht allerdings im Widerspruch zum Denaturierungszustand der Moleküle im gezeigten Absorptionsspektrum (Abbildung 3.10). Die Abnahme der Wahrscheinlichkeit der Adsorption eines Molekülandes auf dem Substrat aufgrund der kleiner werdenden Persistenzlänge und damit des Knäueldurchmessers bei Zunahme der  $\text{Na}^+$ -Konzentration ist dagegen zur Begründung der verringerten Belegungsdichte geeignet.

### Variation des Salzgehaltes

Im folgenden Abschnitt sollen die Experimente mit variabler NaCl-Konzentration diskutiert werden, bei denen der pH-Wert konstant bei 8 gehalten wurde (siehe Abbildung 3.8). Die Ergebnisse zeigen, dass die Zugabe von NaCl zu einer drastischen Beeinflussung der Anzahl gestreckter Moleküle im Prozess des *Molecular Combing* führt. In den Abbildungen 3.11 und 3.12 ist die Molekülanzahl in Abhängigkeit von der Salzkonzentration dargestellt (schwarze Symbole). Aus dem Gang der Anzahl der adsorbierten Moleküle mit der Salzkonzentration ist erkennbar, dass dieser Prozess zumindest durch zwei konkurrierende Mechanismen bestimmt ist.

Ein Mechanismus beruht auf der Stabilisierung des Doppelstranges. Mit steigendem Salzgehalt wird durch die Ladungsabschirmung des Phosphatrückgrates eine Denaturierung der DNA behindert. Die Steigerung der Salzkonzentration führt zu einer Erhöhung der Schmelztemperatur der DNA. Gleichungen, die die Abhängigkeit der Schmelztemperatur vom Salzgehalt der Lösung beschreiben, sind nur für kurze Oligomere bekannt (siehe z. B. Gleichung 2.6 [BAL]). Für lange DNA-Moleküle, wie z. B.  $\lambda$ -DNA, ist eine Beschreibung des Aufschmelzverhaltens wesentlich komplizierter, da weitere Parameter, die das Verhalten des Knäuels in Lösung betreffen, eine Rolle spielen. Trotzdem gilt auch für lange DNA der Zusammenhang zwischen einem steigenden Salzgehalt und der Stabilisierung der DNA-Moleküle.

Ein weiterer Mechanismus, der dem Stabilisierungsmechanismus überlagert ist und zu einer Erhöhung der Anzahl adsorbierter Moleküle führt, ist die Zunahme der Bindungen zwischen DNA und Substrat aufgrund steigender Adsorption von  $\text{Na}^+$ -Ionen auf der DNA bzw. dem Substrat und von  $\text{Cl}^-$ -Ionen auf dem Substrat.



Betrachtet man das im Kapitel *Molecular Combing* diskutierte Bild der Steuerung der Adsorption gestreckter DNA durch die Beziehung zwischen der Adhäsionskraft und der kritischen Meniskuskraft (Abbildung 2.14), so liegt es nahe, den Einfluss der Salzkonzentration auf diese beiden Kräfte zu diskutieren.

Die kritische Meniskuskraft, die zu einem Überstrecken der DNA führt, wird offensichtlich mit einer zunehmenden Anlagerung von positiven  $\text{Na}^+$ -Ionen an die DNA infolge einer zunehmenden Abschirmung der negativen Phosphationen zunehmen. Dabei ist zu beachten, dass hierfür eine vergleichsweise hohe Konzentration von  $\text{Na}^+$ -Ionen notwendig sein wird, damit es nicht nur zu einer punktuellen Stabilisierung der DNA kommt, sondern größere Längenbereiche stabilisiert sind. Andernfalls kann es nicht zu einer effektiven Erhöhung der Fließgrenze der DNA kommen. Ein interessanter Fakt in diesem Zusammenhang ist auch, dass DNA-Moleküle eine für Ionen undurchlässige primäre Hydrathülle besitzen, die in Abhängigkeit vom Salzgehalt aus ungefähr 11 Wassermolekülen pro Nukleotid besteht [SCÄ].

Um zunächst eine Vorstellung zu bekommen, welche Ladungszahlen an DNA und Natriumionen sich bei den verschiedenen untersuchten Salzkonzentrationen gegenüberstehen, soll im folgenden Abschnitt die Anzahl der negativen Ladungen an den Phosphatgruppen und die Anzahl der positiven Ladungen der  $\text{Na}^+$ -Ionen für 1  $\mu\text{l}$  Lösung berechnet werden.

Ein Molekül  $\lambda$ -DNA mit ca. 48500 bp besitzt eine Masse von  $3,2 \cdot 10^7$  Da. Definiert ist:

$$1 \text{ Da} = 1,66 \cdot 10^{-24} \text{ g} \quad \left( \frac{1}{12} \text{ der Masse des } ^{12}\text{C-Atoms} \right).$$

Damit beträgt die Masse eines Moleküls  $5,3 \cdot 10^{-17}$  g. Bei einer DNA-Konzentration von  $28 \text{ ng}/\mu\text{l} = 2,8 \cdot 10^{-8} \text{ g}/\mu\text{l}$  beträgt die Anzahl der Moleküle in 1  $\mu\text{l}$  ca.  $5 \cdot 10^8$ . Multipliziert man diese Teilchenzahl mit der Anzahl der Nukleotide ( $2 \cdot 48500$ ), so erhält man eine Anzahl an negativen Ladungen am Phosphatrücken der DNA von ca.  $5 \cdot 10^{13}$ .

Diesen negativen Ladungen stehen durch die entsprechenden Salzkonzentrationen die folgenden positiven Ladungen gegenüber. Über die Beziehungen zwischen Stoffmenge  $z$ , Masse  $m$ , molare Masse  $M$ , Teilchenzahl  $N$  und der *Avogadro*-Konstante  $N_A$  kann die Anzahl der Teilchen an  $\text{Na}^+$  in den Lösungen berechnet werden.

$$z = \frac{m}{M} \tag{3.2}$$

$$N = z \cdot N_A = \frac{m}{M} \cdot N_A \tag{3.3}$$

Für das Volumen von 1  $\mu\text{l}$  einer 1 M NaCl-Lösung erhält man durch Einsetzen von  $m = 22,9 \cdot 10^{-6} \text{ g}$ ,  $M = 22,9 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$  und  $N_A = 6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$  in Gleichung (3.3) eine Teilchenzahl von  $6,022 \cdot 10^{17} \text{ Na}^+$ . Damit wurden für verschiedene Salzkonzentrationen folgende Teilchenzahlen berechnet:

$$\begin{aligned} N(1 \text{ mM NaCl}) &= 6,022 \cdot 10^{14} \\ N(10 \text{ mM NaCl}) &= 6,022 \cdot 10^{15} \\ N(100 \text{ mM NaCl}) &= 6,022 \cdot 10^{16} \end{aligned}$$

Es wird ersichtlich, dass die positiven Ladungsanteile in einem 10- bis 10000-fachen Überschuss vorliegen. Ein 10-facher Überschuss an  $\text{Na}^+$  reicht offensichtlich nicht aus, um die Adsorption der Moleküle zu beeinflussen. Beleg dafür ist, dass sich die Ergebnisse des *Molecular Combing* bei 0 und 1 mM NaCl nicht unterscheiden. Erst ab einem Salzgehalt von 10 mM wurde bei den Experimenten ein Einfluss des Salzes auf die Adsorption festgestellt (Abbildung 3.8).

Nachfolgend soll versucht werden, die beiden konkurrierenden Mechanismen mit Hilfe eines einfachen phänomenologischen Modells zu beschreiben. Analog der im Abschnitt 2.5.3 betrachteten Modellbildung zur Adsorption der Moleküle soll als charakteristische Länge, die durch das Salz beeinflusst wird, eine (vorerst noch unbekannte) Länge  $l$  verwendet werden. Die Wahrscheinlichkeit für die Stabilisierung dieser Länge mit  $\text{Na}^+$ -Ionen wird proportional  $c^n$  sein mit

$$n = l / a. \quad (3.4)$$

Dabei sind  $c$  die NaCl-Konzentration,  $n$  die Anzahl der Basenpaare,  $l$  die Länge der stabilisierten Kette von Basenpaaren und  $a$  die Länge eines Basenpaarabstandes in nm. Somit kann für die kritische Meniskuskraft  $F_M$  der folgende Ansatz gemacht werden:

$$F_M = F_{M_0} + \varepsilon \cdot c^n \quad (3.5)$$

mit  $\varepsilon$  als einem zunächst unbekannten Proportionalitätsfaktor.

Für die Abschätzung des Einflusses der Salzkonzentration auf die Adhäsionskraft kann von Gleichung (2.18) ausgegangen werden. Mit zunehmender Adsorption von  $\text{Na}^+$ -Ionen auf der DNA bzw. dem Substrat und von  $\text{Cl}^-$ -Ionen auf dem Substrat wird es zu einem Anstieg der Bindung zwischen der DNA und dem Substrat kommen. In erster Näherung kann das durch eine lineare Abhängigkeit von der Salzkonzentration beschrieben werden ( $\beta$  Proportionalitätsfaktor):

$$\tau_{\text{Adsorption}} = \tau_0 + \beta \cdot c \quad (3.6)$$

Eine zusätzliche Abhängigkeit wird durch die Abnahme der Persistenzlänge mit Zunahme der Salzkonzentration gegeben. Hierfür können die in Abb. 2.3 dargestellten Beobachtungen dienen. Interessant ist dabei, dass oberhalb einer Salzkonzentration von 10 mM die Persistenzlänge konzentrationsunabhängig wird, d. h. dass dann  $F_A$  unter Voraussetzung von Gleichung (3.6) linear mit  $c$  ansteigt.

Eine nahe liegende Annahme ist es, davon auszugehen, dass die Zahl der adsorbierten Moleküle  $y$  mit der Differenz aus Adhäsionskraft und kritischer Meniskuskraft ansteigt.

Der einfachste mögliche Ansatz ist

$$y = \text{const.} \cdot (F_A - F_M). \quad (3.7)$$

Unter Verwendung der Gleichungen (2.18), (3.5) und (3.6) folgt daraus für die Konzentrationsabhängigkeit von  $y$ :

$$\begin{aligned} y &= \text{const.} \cdot \left[ (\tau_0 + \beta \cdot c) \cdot l \cdot \frac{\pi D}{4} - F_{M_0} - \varepsilon \cdot c^n \right] \\ &= A + B \cdot c - C \cdot c^n \end{aligned} \quad (3.8)$$

mit  $A$ ,  $B$  und  $C$  als drei von der Salzkonzentration unabhängigen Konstanten, wenn der Konzentrationsbereich  $c > 10$  mM betrachtet wird, in dem die Persistenzlänge bereits konzentrationsunabhängig ist.

Erste Versuche, die Messpunkte (siehe Abbildung 3.11 und 3.12) durch Gleichung (3.8) zu fitten, ergaben den Hinweis, dass die Anzahl der adsorbierten Moleküle oberhalb einer Salzkonzentration von 100 mM maximal wird. Die maximale, experimentell ermittelte Anzahl adsorbierter Moleküle bei  $c = 100$  mM beträgt ca. 300. Betrachtet man die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Moleküle (Abbildung 3.8), dann wird deutlich, dass der maximalen Belegungsichte oberhalb 100 mM eine natürliche Grenze gesetzt ist. Es wird geschätzt, dass bei zwei- bis dreimal so viel Molekülen die gesamte betrachtete Fläche mit Molekülen belegt ist.

Um eine Funktion zu ermitteln, die diesen Sachverhalt der Moleküladsorption beschreibt, wurden alle vier Parameter  $A$ ,  $B$ ,  $C$  und  $n$  freigelassen und vier Werte aus der Kurve genutzt. Als Gleichungen wurden gewählt:

$$y(c = 0) = A \quad (3.9)$$

$$y_{\text{max}} = A + B \cdot c_{\text{max}} - C \cdot c_{\text{max}}^n \quad (3.10)$$

$$c_{\max} = \left( \frac{B}{C \cdot n} \right)^{\frac{1}{n-1}} \quad (3.11)$$

sowie eine Gleichung für den Anstieg der Kurve bei dem zu erwartenden Nulldurchgang bei großen  $c = c_0$

$$\frac{dy}{dc}(c_0) = B_0 - n \cdot C \cdot c_0^{n-1} = B \cdot \left( 1 - \left( \frac{c_0}{c_{\max}} \right)^{n-1} \right) = \frac{y_{\max} - y(0)}{c_{\max} \cdot \left( 1 - \frac{1}{n} \right)} \cdot \left( 1 - \left( \frac{c_0}{c_{\max}} \right)^{n-1} \right) \quad (3.12)$$

Daraus folgt für  $n$ :

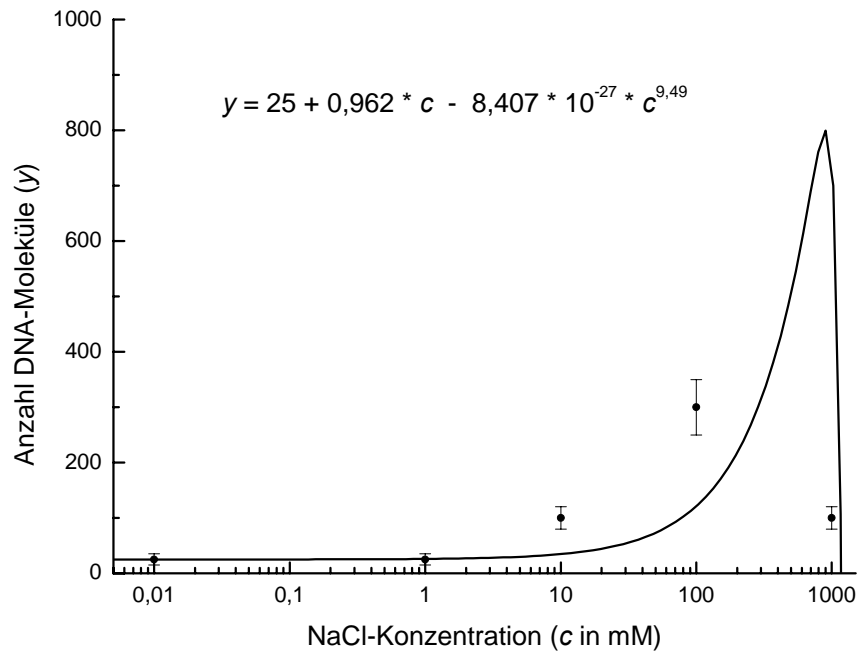
$$n-1 = \frac{\ln \left( 1 - \frac{dy(c_0)}{dc} \cdot \frac{c_{\max} \left( 1 - \frac{1}{n} \right)}{y_{\max} - y(0)} \right)}{\ln \left( \frac{c_0}{c_{\max}} \right)} \approx \frac{\ln \left( 1 + \frac{c_{\max} \left( 1 - \frac{1}{n} \right)}{c_0 - c_{\max}} \right)}{\ln \left( \frac{c_0}{c_{\max}} \right)} \quad (3.13)$$

Es wurden nun für eine "Modell"-Kurve ein mögliches Maximum und eine Nullstelle angenommen:

$$c_{\max} = 900 \text{ mM}, \quad c_0 = 1100 \text{ mM}, \quad y_{\max} = 800$$

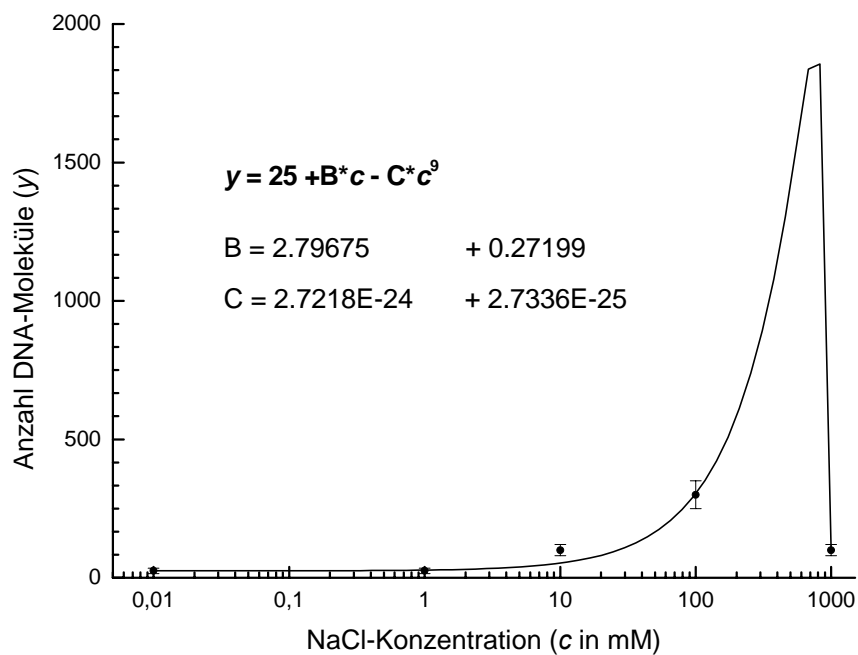
und damit mit Gleichung (3.13) der Wert für die Basenanzahl  $n$  berechnet:  $n = 9,49$ . Dieser Wert erscheint sinnvoll, liegt er doch im Bereich der Basenanzahl der *sticky ends*, die für die Adsorption wesentlich sind. Nach Berechnung der Parameter  $A$ ,  $B$  und  $C$  konnte die Funktion gezeichnet werden (Abbildung 3.11).

Mit dieser Funktion kann die prinzipielle Abhängigkeit der Molekülanzahl von der Salzkonzentration gut beschrieben werden. Deutlich wird, dass der nahezu lineare Anstieg bei mittleren Salzkonzentrationen und der anschließende rasche Abfall oberhalb von 100 mM recht gut durch die beiden Mechanismen zu beschreiben ist, die den Ansätzen für  $F_A$  und  $F_M$  zu Grunde gelegt worden sind.



**Abb. 3.11:** Abhängigkeit der Anzahl der adsorbierten DNA-Moleküle von der NaCl-Konzentration. Punkte stellen die Messwerte dar. Dazu ist der Graph der Funktion  $y = A + B \cdot c - C \cdot c^n$  mit den Parametern  $A = 25$ ,  $B = 0,962$ ,  $C = 8,407 \cdot 10^{-27}$  und  $n = 9,49$  gezeichnet, der modellhaft den Gang der Molekülanzahl in Abhängigkeit vom Salzgehalt beschreibt.

Im nächsten Schritt wurden nun unter Voraussetzung eines ganzzahligen Wertes für die Basenanzahl  $n$  ( $n = 9$ ) und  $A = 25$  die Messwerte angefitet (Abbildung 3.12).



**Abb. 3.12:** Abhängigkeit der Anzahl der adsorbierten DNA-Moleküle von der NaCl-Konzentration. Punkte stellen die Messwerte dar. Der Graph ist ein Fit der Messwerte mit  $n = 9$  und  $A = 25$ .

Die errechnete Funktion beschreibt die Messpunkte sehr gut, die Höhe des Maximums muss allerdings kritisch betrachtet werden. Entsprechend der oben diskutierten natürlichen Begrenzung der Anzahl der adsorbierten Moleküle ist dieser  $\gamma$ -Wert deutlich zu groß. Offensichtlich wird bei solch hohen Salzkonzentrationen die Annahme eines weiteren linearen Ansteigens der Adsorptionskraft mit der Salzkonzentration fragwürdig, da bei der hohen Dichte der adsorbierten DNA deren Wechselwirkung die Adsorption vermindern wird.

In der Literatur gibt es kaum vergleichbare Untersuchungen. *Liu et al.* [LIU] haben den Einfluss von Natriumionen auf das *Molecular Combing* in einem Konzentrationsbereich von 0 bis 200 mM untersucht und fanden ebenfalls eine Erhöhung der Anzahl der Moleküle mit steigendem Salzgehalt. Außerdem schildern sie eine nur schwache Abnahme der Fluoreszenzintensität aufgrund einer verringerten Bindeeffizienz des YOYO-1 in Anwesenheit anderer positiv geladener Ionen [LIU 2], was durch die eigenen Experimente bestätigt werden kann.

### ***Molecular Combing* von Plasmiden**

Interessant ist das Resultat in Abbildung 3.9, das eine hohe Adsorptionsrate von Plasmid-DNA zeigt, obwohl die geschlossenen DNA-Ringe keine bevorzugten Orte für das Aufschmelzen der Moleküle bieten. Das Experiment bestätigt die Ergebnisse der Modellrechnung aus Kapitel 2.5.3, wonach bei doppelsträngiger DNA bereits zwei aufgeschmolzene Basenpaare ausreichen, damit die Adsorption über hydrophobe Wechselwirkungen auf einer PDMS-Oberfläche beginnen kann. Bei ersten Benetzungsinstabilitäten der DNA am Rand des fortschreitenden Tropfens durch zufällig aufgetrennte Basenpaarungen kann die stabile Kraftübertragung zwischen DNA und Oberfläche erfolgen. Das Vorhandensein von Molekülen ist bei den verwendeten Versuchsbedingungen keine notwendige Voraussetzung für eine Adsorption. Sind *sticky ends* existent, dann beginnt, wie die Versuche mit variablem pH-Wert oder Salzgehalt zeigen, die Adsorption stets an den Enden.

Die Plasmidexperimente demonstrieren außerdem die Homogenität des Streckens, die Ausdehnung der Moleküle verhält sich proportional zur Anzahl der Basenpaare.

### 3.4 Übertragung der DNA durch *Transfer Printing*

Nachdem im vorangegangenen Kapitel das Beladen des Stempels durch die Technik *Molecular Combing* diskutiert wurde, soll in diesem Kapitel der Transfer der DNA-Moleküle vom Stempel auf das Glassubstrat dargestellt werden. In einem ersten Abschnitt wird mit Hilfe von rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen der Nachweis der vollständigen Übertragung der Moleküle angetreten. Die nächsten Abschnitte sind der Aufklärung des Transfermechanismus gewidmet. Den Abschluss dieses Komplexes bildet eine erste technische Anwendung, das Stempeln von DNA in eine Struktur mit vorgegebenen Goldkontakten.

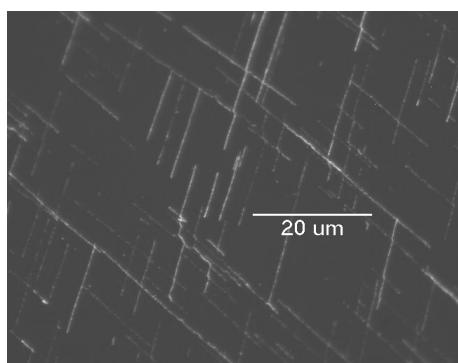
#### 3.4.1 Nachweis des Transfers der Moleküle mit dem AFM

Gestempelte DNA-Moleküle können durch Fluoreszenzmikroskopie abgebildet werden. Mit Hilfe des verwendeten Ölimmersionsobjektives (100 x 1,4) ist es möglich, einen Überblick über die Anordnung der Moleküle in einem relativ großen Probenbereich von ca.  $5000\ \mu\text{m}^2$  zu bekommen. Das Auflösungsvermögen beträgt aber nur ca. 175 nm (siehe Kapitel 3.3.3). Um zu überprüfen, ob beim *Transfer Printing* wirklich das gesamte Molekül übertragen wird, muss eine andere Methode gewählt werden.

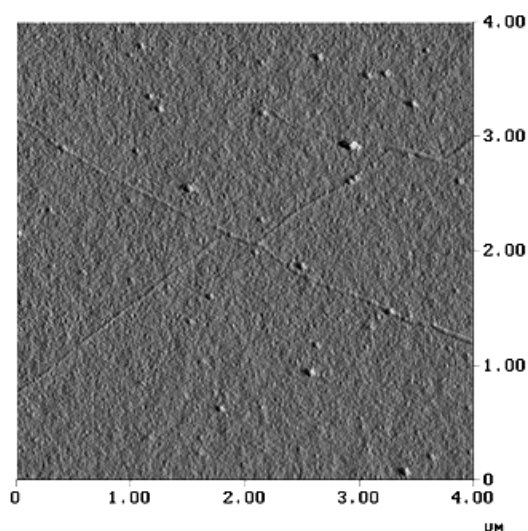
Raster- oder Atomkraftmikroskopie (AFM) ist für die Abbildung von einzelnen DNA-Molekülen an Luft ein geeignetes Abbildungsverfahren, da topografische Strukturen mit einer lateralen Auflösung von 5 bis 10 nm dargestellt werden können. Dafür werden die Biomoleküle auf einer sehr glatten Oberfläche, wie z. B. einer Glimmeroberfläche, immobilisiert. Mit einer feinen, scharfen Spitze mit einem Radius von etwa 10 nm wird nun die Probenoberfläche mechanisch abgetastet. Im vorliegenden Fall musste als Oberfläche die Glasoberfläche des Stempelsubstrates dienen, die nicht so glatt wie der in einem Bereich von  $100\ \mu\text{m}^2$  atomar glatte Glimmer ist und in unregelmäßigen Abständen Vertiefungen besitzt (Abbildung 3.13). Es wurde im *Tapping Mode* gearbeitet, der für weiche, biologische Proben aufgrund der geringen mechanischen Belastung ideal ist.

Für die Abbildung von auf Glas transferierter DNA mit dem AFM wurde ein dichtes DNA-Netzwerk gestempelt, wie es in Abbildung 3.11 in einer fluoreszenzmikroskopischen Übersichtsaufnahme zu sehen ist. Solche Netzwerke und Kreuzungen wurden erzeugt, indem beim Beladen des Stempels zwei Tropfen DNA-Lösung nacheinander so an den Stempelkanten abgesetzt wurden, dass sie in verschiedenen Richtungen über die Stempeloberfläche rollen konnten. So wurden während der Meniskusbewegungen die Moleküle in verschiedenen Richtungen gestreckt.

Abbildung 3.12 zeigt als Beispiel einen mit dem AFM aufgenommenen Ausschnitt aus diesem Netzwerk. Das wesentliche Ergebnis ist die Übertragung der vollständigen DNA-Moleküle beim *Transfer Printing* von der PDMS- auf die Glasoberfläche. Interessant ist außerdem die Entstehung solcher "versetzten" Kreuzungen, wie sie in dieser Abbildung auf dem Glassubstrat zu sehen sind. Damit ist es möglich, die Reihenfolge der Adsorption der Moleküle auf dem Stempel nachträglich zu bestimmen. In der vorliegenden Abbildung adsorbierten die beiden fast parallel von links oben nach rechts unten (oder umgekehrt) laufenden Moleküle zuerst. Das dritte, etwa senkrecht dazu liegende Molekül, wurde an den "Hindernissen" der zuerst adsorbierten Moleküle von der eigenen Streckrichtung abgelenkt.



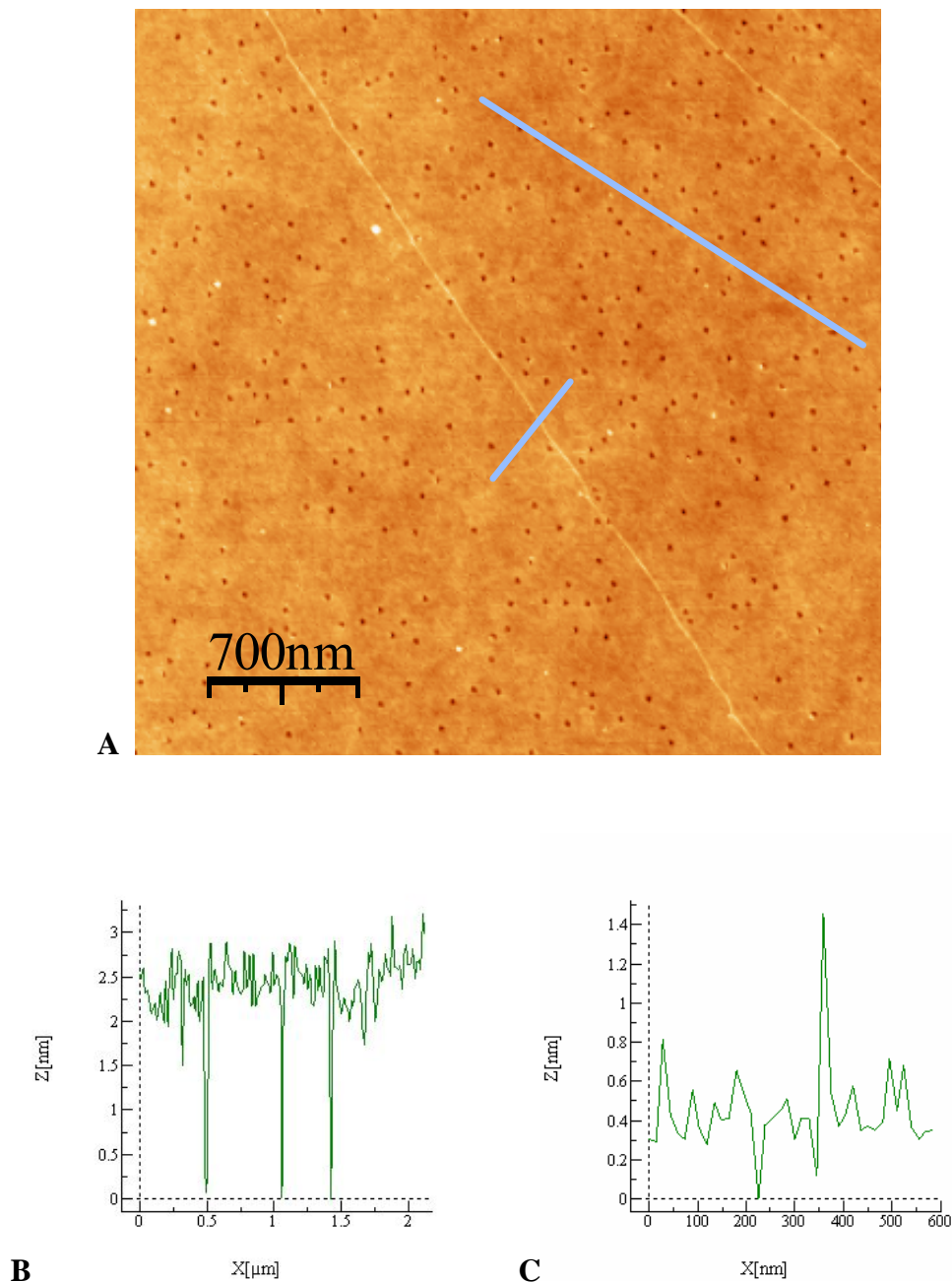
**Abb. 3.11:** Übersicht über ein auf Glas gestempeltes DNA-Netzwerk aus  $\lambda$ -DNA-Molekülen. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme, DNA-Markierung mit YOYO-1.



**Abb. 3.12:** Ausschnitt aus dem DNA-Netzwerk aus Abbildung 3.11. Aufnahme mit dem AFM. DNA-Moleküle sind vollständig übertragen worden.

Abbildung 3.13 zeigt eine weitere rasterkraftmikroskopische Aufnahme von gestempelten DNA-Molekülen. Es handelt sich um ein Höhenbild mit zwei zugehörigen Höhenprofilen, die entlang der blauen Linien aufgenommen wurden. Auf dieser Abbildung ist wiederum zu sehen, dass die DNA während des Stempelns zusammenhängend auf das Glas übertragen worden ist. Deutlich konnte auch die sehr saubere Glasoberfläche mit den typischen, punktförmigen Vertiefungen abgebildet werden, so dass die Aufnahme eines Höhenprofils zur Charakterisierung der Glasoberfläche möglich war (Teilbild B). Die Einsenkungen besitzen eine gleichmäßige Tiefe von ca. 2,5 nm. Das Höhenprofil im Teilbild C, das keine solchen Vertiefungen schneidet, zeigt, dass die Glasoberfläche eine für rasterkraftmikroskopische Abbildungen relativ raue Oberfläche ist. Die DNA-Höhe kann trotzdem mit ca. 1 nm abgeschätzt werden, was mit gemessenen Höhen auf anderen Substraten korreliert.





**Abb. 3.13:** Nachweis der vollständigen Übertragung von DNA beim Transfer auf Glas.

**A)** Höhenbild einer rasterkraftmikroskopischen Aufnahme. Sehr saubere Glasoberfläche mit den typischen punkartigen Vertiefungen. Entlang der beiden blauen Linien wurden die Höhenprofile B und C aufgenommen.

**B)** Höhenprofil zur Charakterisierung der Glasoberfläche (längere Linie). Der Schnitt durch drei der Vertiefungen zeigt deren Tiefe mit ca. 2,5 nm an.

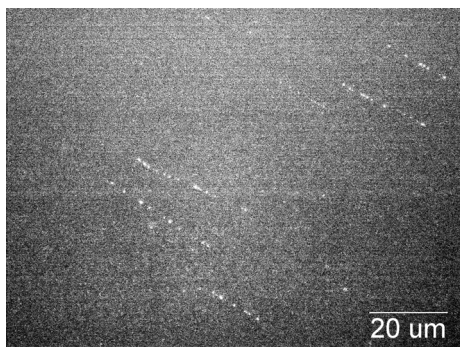
**C)** Höhenprofil zur Messung der Höhe des DNA-Moleküls (kürzere Linie). Obwohl keine Vertiefungen geschnitten wurden, ist die Glasoberfläche sehr rau, so dass die Dicke der DNA mit ca. 1 nm abgeschätzt werden kann.

### 3.4.2 Experimente zur Untersuchung des Transfermechanismus

Die bisher dargestellten Experimente zeigen das erfolgreiche Arbeiten und die Reproduzierbarkeit der *Transfer-Printing*-Methode. Der Mechanismus der Übertragung der DNA-Moleküle vom Stempel auf das Substrat ist aber noch ungeklärt. Warum ist es möglich, die auf der PDMS-Oberfläche adsorbierten Moleküle auf die Glasoberfläche zu übertragen? Es wird vermutet, dass der Übertragungsmechanismus mit der Hydrophilie der beiden Oberflächen in Zusammenhang steht. Auf dem Glas befindet sich aufgrund von nichtabgesättigten freien Bindungen unter Normalbedingungen stets eine mehrere Nanometer dicke Wasserschicht, während die PDMS-Oberfläche relativ trocken ist (siehe Kapitel 3.2). Um den Einfluss von Wassermolekülen, die sich auf den Oberflächen befinden, analysieren zu können, wurden Stempelexperimente unter modifizierten Versuchsbedingungen durchgeführt. So wurde der Feuchtigkeitsgehalt der Luft variiert und das Stempeln nach verschiedenen Lagerungszeiten des Stempels untersucht.

#### ***Transfer Printing* mit Lagerungszeiten des Stempels bei unterschiedlich hoher Luftfeuchte**

Der Stempelprozess wurde bei diesen Experimenten wie in Kapitel 3.1 beschrieben durchgeführt, aber zwischen dem Zeitpunkt des Beladens des Stempels und dem eigentlichen Stempeln wurden Wartezeiten eingebaut. Während dieser Zeiten wurden die Stempel entweder an Raumluft mit ca. 40 % Luftfeuchte oder in einer Feuchtebox mit ca. 100 % Luftfeuchte gelagert. Die Stempelergebnisse zeigten, dass nach 3 min Lagerung an Raumluft noch mit hoher Übertragungsrate gestempelt werden konnte, das Stempeln nach einer Liegezeit von 5 min aber nicht mehr möglich war. Wie in Abbildung 3.14 zu sehen ist, konnten nur wenige, zerbrochene Moleküle auf das Glas übertragen werden. Das bedeutet, 5 min nach dem Beladen des Stempels ist dieser schon zu trocken und kann nicht mehr für einen Molekültransfer genutzt werden. Wurde der Stempel dagegen unter hoher Luftfeuchte aufbewahrt, konnte die Liegezeit sogar auf 45 min ausgedehnt und anschließend mit gutem Ergebnis gestempelt werden.



**Abb. 3.14:** *Transfer Printing* mit einer Lagerungszeit des Stempels an Raumluft (ca. 40 % Luftfeuchte) zwischen Beladen und Transfer von 5 min. Aufgrund der Trocknung der Stempeloberfläche konnten nur wenige, zerbrochene Moleküle übertragen werden. (Kontrast in der Aufnahme stark nachbearbeitet).

In einem nächsten Experiment wurde versucht, einen Stempel zu reaktivieren, der zuvor 5 min an Raumluft gelagert worden war. Dazu wurde auf die Stempeloberfläche ein Wassertropfen aufgesetzt und nach 30 s wieder abgezogen. Nach dieser Rehydratation war der Transfer der DNA wieder möglich.

Diese Experimente zeigen, dass der Stempel für einen erfolgreichen Stempelprozess nicht trocken werden darf. Die Anwesenheit von Wassermolekülen entlang der DNA-Stränge ist für den Transfer der DNA unerlässlich.

### ***Transfer Printing unter Stickstoffatmosphäre***

Der gesamte Stempelprozess wurde unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt. So konnte die Luftfeuchtigkeit und damit der Wasseranteil auf dem Glas und entlang der DNA-Moleküle auf dem Stempel minimiert werden.

Der mit DNA beladene PDMS-Stempel und das Glassubstrat wurden in eine Handschuhbox eingeführt und diese mehrfach mit Stickstoff gespült. Unter Stickstoffatmosphäre wurde der Stempel auf das Substrat aufgedrückt und nach 5 s wieder abgehoben. Die mikroskopische Untersuchung von Glas und Stempel nach dem Ausschleusen ergab nahezu keine Übertragung der Moleküle, diese befanden sich immer noch auf dem Stempel.

Auch dieses Experiment zeigt die Notwendigkeit des Vorhandenseins von Wassermolekülen sowohl auf dem Stempel als auch auf dem Substrat. Andererseits ist es mit diesem Wissen möglich, den Stempelprozess durch Trocknung einer der beiden Stempelpartner gezielt zu verhindern.

### 3.4.3 Transfermechanismus

Die im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Experimente haben gezeigt, dass die Übertragung der adsorbierten DNA-Moleküle auf ein Substrat sowohl von den Oberflächeneigenschaften der beiden Stempelpartner hinsichtlich Hydrophilie als auch vom Feuchtegehalt der Umgebungsatmosphäre abhängt. Der amphiphile Charakter der DNA, aufgrund dessen die Moleküle mit polaren und nicht polaren Oberflächen in Wechselwirkung treten können, spielt ebenfalls eine Rolle. Der polare Phosphatrücken bedingt die Wasserlöslichkeit und damit gute Adsorption auf hydrophilen Materialien. Durch den hydrophoben Kern der DNA, der im aufgeschmolzenen Zustand des Moleküls nach außen gekehrt vorliegt, ist außerdem eine Adsorption auf hydrophoben Oberflächen möglich.

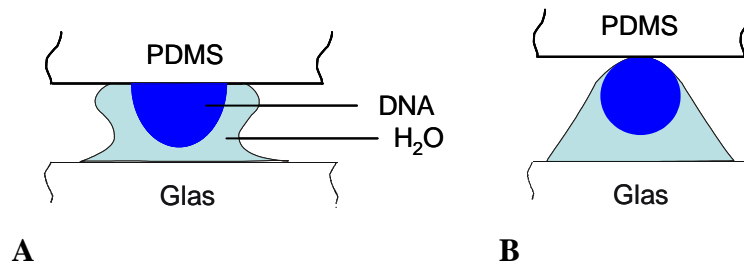
Für einen Transferprozess unter Normalbedingungen ergibt sich die folgende Ausgangssituation: DNA-Moleküle liegen in gestreckter Konformation auf der PDMS-Oberfläche adsorbiert vor. Wegen der Hydrophobie des PDMS (siehe Abschnitt 3.2) ist diese Oberfläche nach dem Abgleiten des Tropfens nahezu trocken. Lediglich entlang der DNA-Moleküle müssen sich, aufgrund des teilweise hydrophilen Charakters der DNA, Wassermoleküle befinden. Diese Wassermoleküle tragen zur Stabilisierung der Struktur der DNA bei und sind eine notwendige Voraussetzung für einen erfolgreichen Stempelprozess. Die Wasserschicht auf dem hydrophileren Glassubstrat bildet eine weitere wesentliche Grundlage.

Resultierend aus den experimentellen Beobachtungen wird der folgende Mechanismus für die Übertragung der DNA vorgeschlagen und in Abbildung 3.15 dargestellt.

In der ersten Phase, dem Aufsetzen des Stempels, kommt es zur Berührung des PDMS mit der Glasoberfläche (Teilbild A). Die DNA-Moleküle kommen dabei mit beiden Oberflächen in Kontakt, es wirken Anziehungskräfte sowohl in Richtung des PDMS (hydrophobe Wechselwirkungen, Adhäsion) als auch in Richtung des Glases (polare Wechselwirkungen (Dipol-Dipol), Adhäsion, Wechselwirkungen zwischen negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA und den Protonen der Hydroxylgruppen der Wasserschicht auf dem Glas).

In der zweiten Phase, dem Abheben des Stempels, kommt es zur eigentlichen Übertragung der DNA-Moleküle von der PDMS- auf die Glasoberfläche (Teilbild B). Der Wasserlayer auf dem Glas nimmt nach dem Prinzip des kapillaren Greifens die DNA mit den adsorbierten Wassermolekülen auf. Diese Wassermoleküle vermitteln den Kontakt zum Wasserlayer des Glases. Der Wasserlayer darf aber nur wenige Nanometer dünn sein, dass beim Transfer die gestreckte Konformation der Moleküle erhalten bleibt und die DNA nicht wieder in Lösung geht.

Für einen erfolgreichen Molekültransfer muss die Substratoberfläche immer hydrophiler sein als die Stempeloberfläche.



**Abb. 3.15:** Schematische Darstellung des Stempelablaufs [BEK].

**A)** Aufsetzen des Stempels. Es kommt zu Wechselwirkungen zwischen DNA und beiden Oberflächen.

**B)** Beim Abheben des Stempels findet die eigentliche Übertragung der DNA vom PDMS auf das Glas statt. DNA-Moleküle werden mit der sie umgebenden Wasserhülle vom Wasserlayer der Glasoberfläche nach dem Prinzip des kapillaren Greifens übernommen. Dabei bleibt die gestreckte Konformation der Moleküle erhalten.

Die Kenntnis des Transfermechanismus ist für die Anwendung des *Transfer-Printing*-Verfahrens wichtig. Materialien für Stempel und Substrat können entsprechend der jeweiligen Aufgabe gezielt ausgewählt oder deren Oberflächen modifiziert werden. Durch Plasmaglimmen ist es z. B. möglich, den Grad der Hydrophobie der PDMS-Oberfläche und damit die Länge der Moleküle beim Beladen des Stempels zu variieren. Dabei muss aber immer beachtet werden, dass die Stempeloberfläche hydrophober bleibt als die Substratoberfläche.

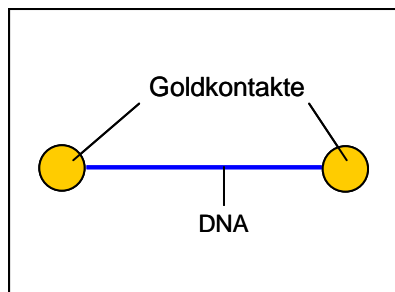
Außerdem ist es möglich, durch die Einstellung der Luftfeuchte auf den Stempelprozess einzuwirken. Das Arbeiten unter Normalbedingungen erfordert ein zügiges Vorgehen, damit der Stempel nicht zu trocken wird. Im Gegensatz zur Wasserschicht auf der Glasoberfläche befindet sich die Hydrathülle an der DNA unter diesen Bedingungen nicht im Gleichgewicht mit der umgebenden Atmosphäre und verdunstet. Die Hydrathülle wird aber zur Vermittlung des Kontaktes zum Wasserlayer des Glases benötigt. Eine fehlende Hydrathülle führt außerdem zu einer Destabilisierung der DNA-Struktur, sodass die Moleküle bei mechanischer Belastung leicht zerreißen (siehe Abbildung 3.14).

Ist das Experiment zeitintensiver, weil z. B. eine exakte Positionierung von Stempel und Substrat notwendig ist (siehe nachfolgendes Kapitel 3.5), dann muss der Stempel in einer feuchten Atmosphäre aufbewahrt werden, in der die Hydrathülle um die DNA-Moleküle erhalten bleibt.

### 3.5 Technische Anwendung: Stempeln in Kontaktstrukturen

Eine mögliche Anwendung der Stempeltechnik stellt das zielgerichtete Ablegen von gestreckten DNA-Molekülen in eine Struktur mit Kontaktflächen dar. Ziel ist hierbei die Herstellung einer elektrisch leitenden Verbindung zwischen zwei Goldkontakten. Die Realisierung der Leitfähigkeit für technische Zwecke soll aber nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit sein. Dafür gibt es Lösungsansätze, wie z. B. die Metallisierung der DNA (siehe Kapitel 1) oder die Kopplung einer DNA mit einer Kohlenstoffnanoröhre, wobei deren herausragende elektrische Leitfähigkeit ausgenutzt wird.

In diesem Kapitel soll ausschließlich das Stempeln von DNA-Molekülen in eine Goldkontaktstruktur vorgestellt werden, wie es in Abbildung 3.16 als Prinzipskizze dargestellt ist. Das Stempeln von gestreckten DNA-Molekülen in strukturierte Substrate ist neu und wurde in der Literatur bisher nicht gezeigt. Druckverfahren für DNA auf glatte Oberflächen, aber mit strukturierten Stempeln sind veröffentlicht worden, wobei sich die Methode von *Gad et al.* deutlich von der hier beschriebenen unterscheidet: Die PDMS-Stempel wurden mit einer Aminosilanschicht chemisch funktionalisiert, während die Stempel in der vorliegenden Arbeit ohne Modifikation genutzt wurden [GAD, GUA].

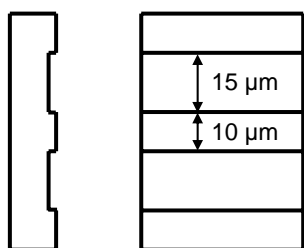


**Abb. 3.16:** Anwendung des DNA-Stempelns: Ein gestrecktes DNA-Molekül wird zwischen zwei Goldkontakten immobilisiert.

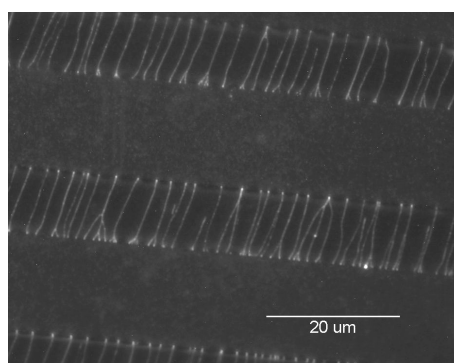
Als Substrate dienten Deckgläschen, auf die mit Hilfe von Masken (TEM-Netzchen) Golddots mit Höhen von ca. 30 bis 90 nm als Kontakte aufgedampft wurden. Es wurden Maskengrößen verwendet, mit denen Abstände zwischen zwei Kontakten von 10  $\mu\text{m}$  und 20  $\mu\text{m}$  realisiert werden konnten, denn diese Längen können von einer gestreckten  $\lambda$ -DNA überbrückt werden. Auch die Durchmesser der Golddots wurden variiert und betrugen 5  $\mu\text{m}$  (wie in Abbildung 3.20) oder 10  $\mu\text{m}$ . Durch das Aufbringen der Goldkontakte entstanden topografisch strukturierte Substrate. Diese Strukturierung zog eine wesentliche Neuerung in der Stempeltechnik nach sich: Die PDMS-Stempel mussten ebenfalls mit einer passenden Struktur versehen werden. Versuche, mit einem glatten Stempel zwischen die Kontakte zu stempeln, funktionierten selbst bei den flachsten Golddots mit 30 nm Höhe nicht. Strukturierte Stempel haben außerdem den Vorteil, dass die Länge der zu



stempelnden DNA-Moleküle durch die Abmessungen der Struktur exakt vorgegeben wird. Abbildung 3.17 zeigt das Prinzip solch eines strukturierten Stempels mit erhabenen Streifen. Das Beladen des Stempels durch *Molecular Combing* geschah so, dass die gestreckten DNA-Moleküle senkrecht zur Streifenstruktur adsorbieren konnten. Ein mit  $\lambda$ -DNA beladener Strukturstempel ist in Abbildung 3.18 zu sehen. Die für die Übertragung der Moleküle relevante Streifenbreite betrug hier 10  $\mu\text{m}$ . Es fällt sowohl in diesem Bild als auch in Abbildung 3.20 D mit einer Strukturbreite von 20  $\mu\text{m}$  auf, dass die meisten Moleküle die gesamte Streifenbreite überspannen. Die Adsorption beginnt also bevorzugt an den Kanten der Struktur.



**Abb. 3.17:** Seitenansicht und Draufsicht eines Stempels mit einer Streifenstruktur. Die Grabenbreite beträgt 15  $\mu\text{m}$  und die Breite der erhabenen Streifen 10  $\mu\text{m}$ . Tiefe der Struktur: 2  $\mu\text{m}$ .

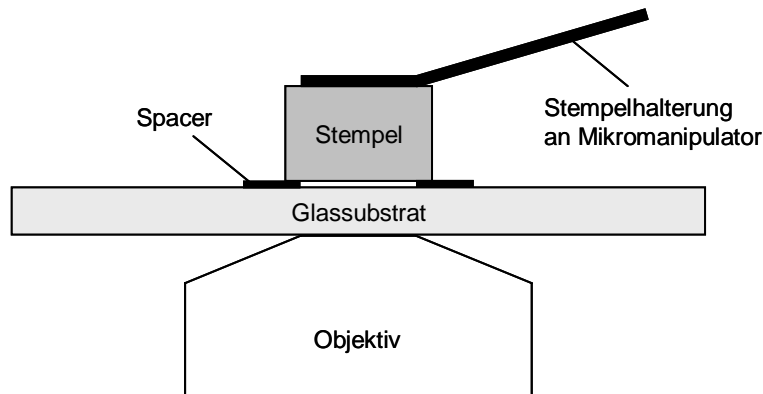


**Abb. 3.18:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines mit  $\lambda$ -DNA-Molekülen beladenen, strukturierten PDMS-Stempels.

Das Beladen der Strukturstempel mit DNA kann grundsätzlich mit verschiedenen Techniken erfolgen, sie führen zu unterschiedlichen Ergebnissen. Eine gleichmäßige Anordnung der Moleküle, parallel zueinander und senkrecht zur Streifung der Struktur, wurde nur durch Tauchen des Stempels in die Lösung mit DNA-Molekülen erreicht. Bei dieser Arbeitsweise konnte ein genügend großes Flüssigkeitsvolumen die Stempeloberfläche beim Herausziehen des Stempels überstreichen. Die „Methode des gleitenden Tropfens“, die bei den unstrukturierten Stempeln Anwendung fand, führte nur auf einer schmalen Fläche in der Mitte des Stempels zu parallel ausgerichteten Molekülen. In den Randgebieten adsorbierten die DNA-Moleküle in gekrümmter Form, was darauf hindeutet, dass der Tropfen nicht mit einer einheitlichen Grenzlinienfront über den Stempel gleitet, sondern, dass sich aufgrund der strukturierten Oberfläche ein besonderes Bewegungsregime einstellt.

Für das Aufsetzen des Stempels in die Struktur des Substrates musste ein Verfahren erarbeitet werden, das ein zügiges Vorgehen erlaubt, damit die Stempeloberfläche nicht

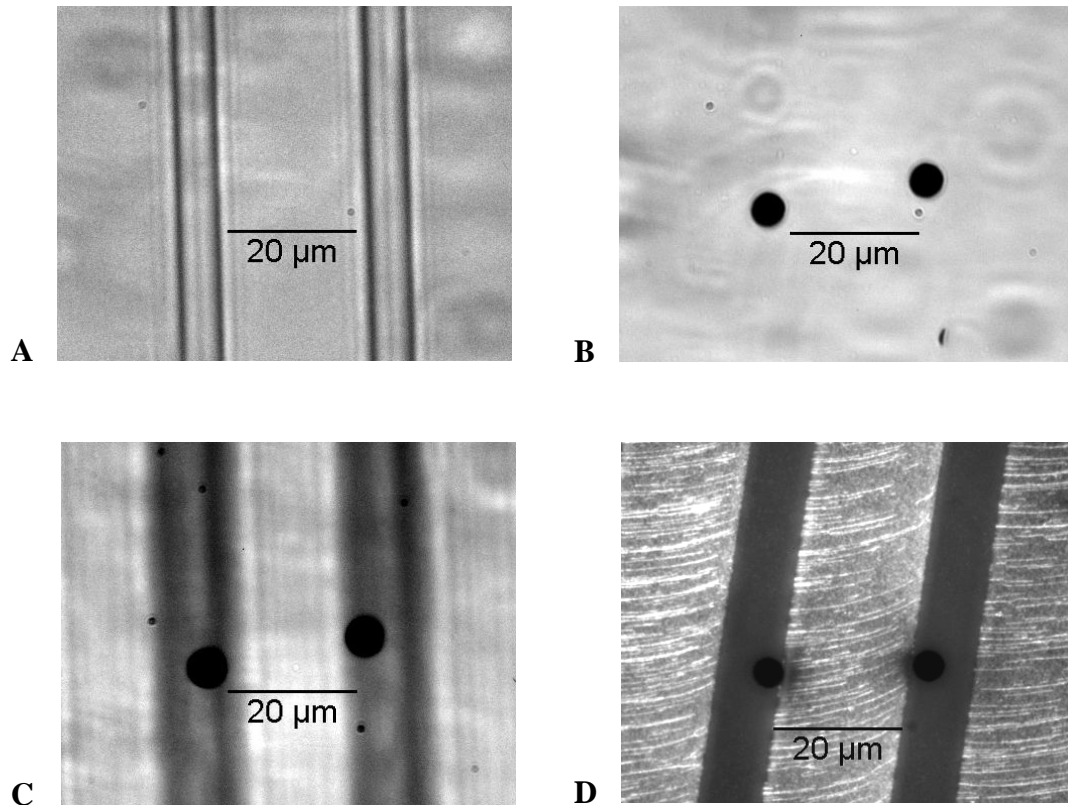
trocken wird (siehe Abschnitt 3.4.3). Es kam ein inverses Lichtmikroskop zum Einsatz, das die Beobachtung von unten durch das Glassubstrat ermöglicht. Mit einem in drei Achsen steuerbaren, motorgetriebenen Mikromanipulator konnte der Stempel oberhalb des Glases geführt werden. Der experimentelle Aufbau ist in Abbildung 3.19 dargestellt.



**Abb. 3.19:** Experimenteller Aufbau zur Positionierung von Stempel und Kontaktstruktur. Bis zum Beenden der Positionierung verhindern Spacer zwischen Stempel und Substrat ein Übertragen der DNA-Moleküle auf das Glas.

Der Ablauf eines Experimentes zur exakten Positionierung von Stempel und Substrat unter mikroskopischer Beobachtung ist in Abbildung 3.20 dargestellt. Der erste Schritt bestand in der Festlegung der Streifenrichtung des Stempels, wozu der Stempel durch ein unstrukturiertes Glassubstrat betrachtet wurde (Teilbild A). Danach wurde das Glas mit der Kontaktstruktur im Sichtfeld des Mikroskops positioniert und unverrückbar mit der Halterung verankert (Teilbild B). Nachdem auf die Ränder der Struktur Streifen aus 10  $\mu\text{m}$  dicker Polyimidfolie als Spacer gelegt wurden, konnte der Stempel auf die Struktur gesetzt und durch leichtes Verschieben genau positioniert werden (Teilbild C). Die Spacer verhinderten ein vorzeitiges Übertragen der DNA. Mit dem Mikromanipulator, der nach einer x-y-Positionierung nun nur noch in z-Richtung bewegt wurde, wurde der Stempel von oben gefasst und leicht angehoben, so dass die Spacer entfernt werden konnten. Anschließend wurde der Stempel auf das Substrat aufgesetzt, im Fall einer Beladung konnten nun die Moleküle in die Struktur gestempelt werden (Teilbild D).





**Abb. 3.20:** Ablaufs eines Experimentes zur exakten Positionierung von Stempel und Substrat im Lichtmikroskop (A-C) und Ergebnis des Stempelns von  $\lambda$ -DNA-Molekülen zwischen Goldkontakte des Glassubstrates (D).

**A)** Festlegung der Richtung der Streifenstruktur des Stempels.

**B)** Positionierung der Kontaktstruktur im Sichtfeld des Mikroskops.

**C)** Positionierung des Stempels, passend zur Kontaktstruktur. In die Randbereiche zwischen Stempel und Substrat eingelegte Spacer aus 10  $\mu\text{m}$  dicker Folie lassen dabei ein Verschieben des Stempels zu und verhindern die vorzeitige Übertragung der DNA-Moleküle. Nach Entfernen der Spacer sitzt der Stempel auf dem Substrat auf.

**D)** Wurde der Stempel vor der Positionierung mit DNA-Molekülen beladen, so können diese zwischen den Kontakten abgelegt werden.

Mit dieser Positioniermethode war es möglich, DNA-Moleküle in eine Struktur mit Goldkontakten zu stempeln. Trotz der guten Reproduzierbarkeit wurden aber Grenzen des Verfahrens sichtbar, die durch die verwendeten Geräte zustande kamen und die bei einer Anwendung der Methode außerhalb eines Labors beachtet werden müssen. Eine der Grenzen wird durch die Ungenauigkeit des Mikromanipulators gesetzt, der aufgrund seiner mechanischen Arbeitsweise Toleranzen im  $\mu\text{m}$ -Bereich aufweist. Außerdem ist eine exakte Fokussierung des über dem Glas „schwebenden“ Stempels unmöglich, da es wegen des Luftspaltes zwischen Glas und PDMS zu zusätzlichen Lichtbrechungen an den Grenzflächen zur Luft kommt.

## 4 DNA-Verknüpfungen mittels Tet-Repressor-Protein

In diesem Kapitel wird der Aufbau von DNA-Verknüpfungen mit Hilfe des DNA-bindenden Tet-Repressor-Proteins (TetR) verfolgt. Ziel ist es, grundlegende Methoden für die Entwicklung von Netzwerken aus DNA und Bindeproteinen zu erarbeiten. Das aus der bakteriellen Genregulation bekannte Tet-System wird hier in einem technologischen Kontext betrachtet.

Nach der Vorstellung des Tet-Systems und der Charakterisierung der verwendeten DNA-Template und TetR-Proteine wird zuerst der Schwerpunkt auf die entwickelten Methoden für den Nachweis sowie die Abbildung des DNA-Protein-Komplexes gelegt. Wichtig ist der Nachweis der Bindung des TetR an eine  $\lambda$ -DNA mit *tet*-Operator-Sequenz (*tetO*), denn diese DNA wird aufgrund ihrer Länge für den Aufbau von DNA-Netzwerken von Bedeutung sein. Im Anschluss daran wird die Herstellung von Verknüpfungen zweier DNA-Moleküle mit einem modifizierten TetR-Protein gezeigt. Diese Verknüpfungen stellen die kleinsten Einheiten für ein DNA-Protein-Netzwerk dar.

### 4.1 Das Tet-System

In den Zellen Gram-negativer Bakterien reguliert der Tet-Repressor auf Transkriptionsebene die Resistenz gegen das Antibiotikum Tetrazyklin [SAE]. Er fungiert dabei als biologischer Schalter, denn er kann verschiedene Funktionen ausführen:

- Durch die Bindung von TetR an die spezifische *tetO*-Sequenz der DNA wird die Biosynthese des Resistenzproteins inhibiert (Funktion der spezifischen Bindung an die *tetO*-Sequenz der DNA, Repression).
- Tritt Tetrazyklin in die Zelle ein, dann wird dieses als Komplex mit einem zweiwertigen Metallion von TetR gebunden. Die dadurch hervorgerufenen Konformationsänderungen im TetR-Protein bewirken, dass die Operator-DNA freigegeben und das Resistenzprotein exprimiert wird (Funktion der Induktion der Genexpression durch Bindung von Tetrazyklin).
- Eine dritte Funktion ist die Dimerisierung zur Bildung des aktiven Repressors.

Bei allen drei Funktionen spielt die molekulare Erkennung eine bedeutende Rolle: bei der Spezifität der Erkennung der Monomere zur Dimerbildung, bei der Erkennung des *tet*-Operators und bei der spezifischen Bindung von Tetrazyklin [SCH 1]. Im folgenden Abschnitt werden die drei Funktionen kurz erläutert.

### **Dimerisierung**

In seiner aktiven Form liegt TetR als Dimer vor. Die Dimerisierung erfolgt über ein 4-Helix-Bündel, das durch die Helices  $\alpha 8$  und  $\alpha 10$  beider Monomere gebildet wird (siehe Abbildung 4.2). Die Helices  $\alpha 7$  und  $\alpha 9$  sind zusätzlich an der Dimerisierung beteiligt. Die Bindung erfolgt im Wesentlichen über hydrophobe Wechselwirkungen, außerdem werden 22 Wasserstoffbrücken innerhalb der Dimerisierungsfläche ausgebildet. Durch diesen Kontakt sind 27 % der solvenzzugänglichen Oberfläche jedes Monomers gebunden [SCH 1, LED 1].

Untersuchungen zur konzentrationsabhängigen Monomerisierung ergaben, dass das Gleichgewicht bei den in dieser Arbeit verwendeten TetR-Konzentrationen weit auf der Seite des Dimers liegt [BIB].

### **Spezifische Bindung an den *tet*-Operator**

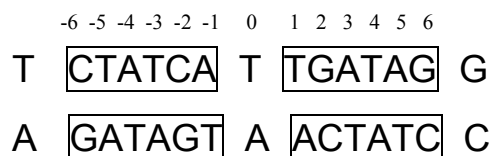
TetR bindet an die palindrome DNA-Sequenz des *tet*-Operators, 12 Basenpaare werden dabei erkannt (Abbildung 4.1). Die Bindung erfolgt über ein Helix-Turn-Helix-Motiv, dabei bildet Helix  $\alpha 2$  die Positionierungshelix,  $\alpha 3$  die Erkennungshelix und  $\alpha 1$  dient der konformativen Fixierung der beiden (Abbildung 4.2) [SCH 1, HIN]. Der Abstand zwischen den Erkennungshelices beider Monomere liegt bei 3,4 nm, so dass sie in zwei aufeinander folgende große Furchen der DNA passen. Die an der spezifischen Bindung zwischen TetR und *tetO* beteiligten Basen und Phosphatgruppen sind bekannt [HEU, SIZ], ebenso die entsprechenden Aminosäurereste in der Erkennungs- und Positionierungshelix [WIS, LED 1]. Diese bilden Wasserstoffbrückenbindungen zu den Basen der Nukleotide 2 bis 6 des Operators, außerdem werden Phosphatkontakte zu beiden Strängen ausgebildet.

Die Affinität für *tetO* hängt von der Ionenstärke ab. Bei der Bestimmung der Bindekonstante spielen außerdem das verwendete Verfahren und die Versuchsbedingungen eine Rolle. So kommt es, dass für die Bindekonstante verschiedene Messwerte angegeben werden, z. B.  $2 \cdot 10^{11} \text{ M}^{-1}$  für eine physiologische NaCl-Konzentration von 160 mM [LED 1] oder  $5,6 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$  [KAM]. Für eine unspezifische Bindung ist die Bindekonstante unter gleichen Bedingungen wesentlich geringer, sie wurde z. B. mit  $3 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1}$  ermittelt [LED 1]. Durch die Bindung von Tetrazyklin nimmt die Affinität für *tetO* um etwa sechs bis neun Größenordnungen ab [LED 2].

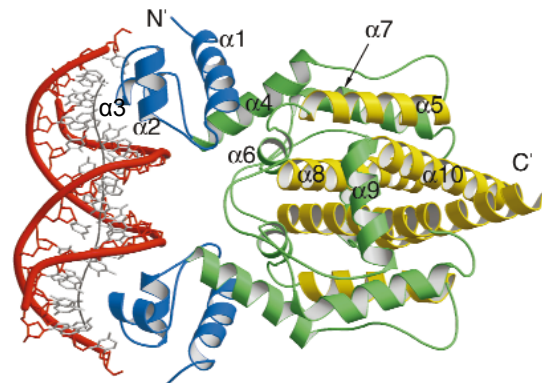
Die Bindung von TetR an *tetO* erfolgt in einem zweistufigen Prozess. Im ersten, schnellen Schritt wird ein intermediärer Komplex gebildet, der einer unspezifischen Bindung

entspricht. Im zweiten Schritt geht dieser Komplex in den spezifischen Repressor-Operator-Komplex über [LED 1].

Der Besetzungsgrad von TetR zu *tetO* ist konzentrationsabhängig. Mit steigender Proteinkonzentration steigt die Wahrscheinlichkeit für eine Bindung.



**Abb. 4.1:** Sequenz des 15 Basenpaare langen *tet*-Operators. Eingerahmt sind die 2x6 Basenpaare, die die palindrome Symmetrie enthalten (nach [ORT]).



**Abb. 4.2:** Struktur des TetR-*tetO*-Komplexes. blau:  $\alpha$ -Helices der DNA-bindenden Domäne, gelb:  $\alpha$ -Helices, die bei Induktion keine Bewegung ausführen, grün: an Konformationsänderung beteiligte  $\alpha$ -Helices, rot: DNA-Doppelhelix (*tetO*). Die graue Linie innerhalb der DNA zeigt die Biegung der Helix, die durch die TetR-*tetO*-Bindung entsteht (nach [ORT]).

### Bindung des Induktors Tetrazyklin

Tetrazyklin wird als Komplex mit zweiwertigen Metallionen, wie z. B.  $Mg^{2+}$ , in einer Bindetasche im Inneren des Proteins gebunden. Die Bindekonstante dafür ist ebenfalls sehr hoch, sie wird z. B. mit  $5 \cdot 10^9 M^{-1}$  [SCH 1] angegeben. An der Bindung sind Aminosäuren aus beiden Monomeren beteiligt, es kommt zur Ausbildung von hydrophilen und hydrophoben Wechselwirkungen zu 16 Aminosäureresten von TetR. Infolge dieser Induktorbindung bewegen sich die Erkennungshelices der Monomere voneinander weg, so dass sich deren Abstand um 3 Å vergrößert. Durch diese Abstandsänderung wird die Affinität zur Operatorsequenz so weit verringert, dass der induzierte Repressor abdissoziiert [SCH 1].

Aus der Gruppe des Tetrazyklins und der Tetrazyklin-Derivate ist das Anhydrotetrazyklin der effizienteste Induktor, er bindet TetR mit einer Bindekonstante von  $1,26 \cdot 10^{12} M^{-1}$  [SCH 2].

Aus biologischer und chemischer Sicht sind das TetR-Protein und dessen Funktionen bei der Regulation der Transkription ausführlich charakterisiert worden. Für die vorliegende Arbeit ist vor allem die Funktion der spezifischen DNA-Bindung wesentlich. Die hohe Affinität des TetR-Proteins zur *tetO*-Sequenz ist der Grund für die Auswahl des DNA-Bindeproteins, um an diesem Beispiel die Möglichkeiten des Aufbaus eines technischen DNA-Netzwerkes zu untersuchen.

## 4.2 Eingesetzte DNA-Fragmente mit *tetO*-Sequenz und TetR-Proteine

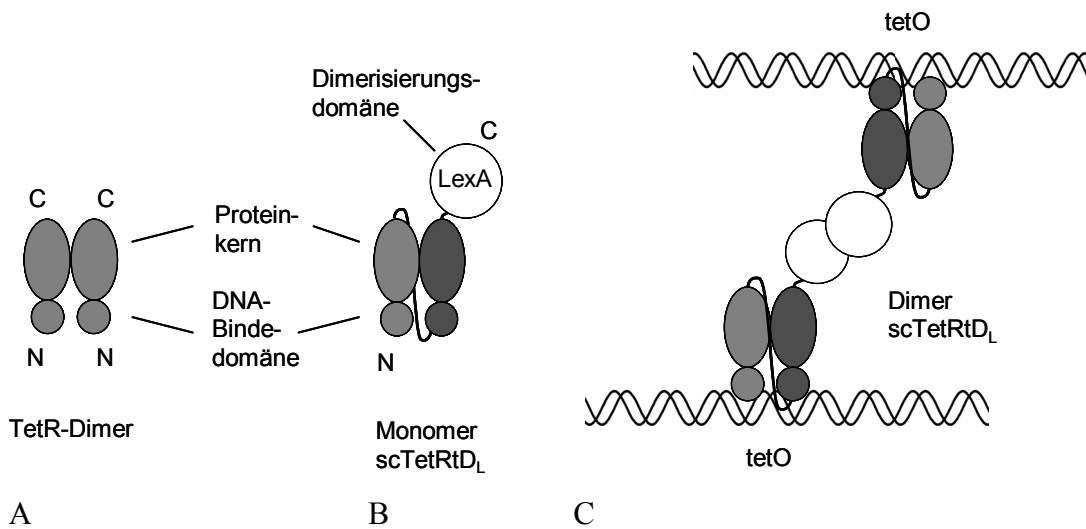
Für die Bindeexperimente wurden DNA-Fragmente mit verschiedenen Moleküllängen und mit verschiedener Anzahl an *tet*-Operatoren verwendet. Grundlage für die Herstellung des größten Teils der Fragmente war das Plasmid pUC19/AV16. Dieses Plasmid hat eine Größe von 3028 Basenpaaren, eine Konturlänge von ca. 1  $\mu$ m und trägt einen *tet*-Operator. Damit über TetR-Bindung mehrere Varianten an DNA-Konstrukten aufgebaut werden konnten, wurde das Plasmid mit verschiedenen Restriktionsenzymen linearisiert, sodass sich *tetO* an verschiedenen Positionen innerhalb des Moleküls befindet. Außerdem wurden durch Verdau des Plasmids kürzere DNA-Fragmente mit einer Länge von 200 bis 400 Basenpaaren (bp) als Template erzeugt.

Die Amplifikation *tetO*-tragender DNA ist auch durch Polymerasekettenreaktion möglich. Mit dieser Methode wurden 568 bp-Fragmente hergestellt. Dieses Verfahren erwies sich aber als weniger effektiv, da neben dem Zielfragment in allen Fällen zwei kleinere Fragmente entstanden sind, die keine vollständige *tetO*-Sequenz aufwiesen. Diese Fragmente entsprachen in ihren Längen genau den beiden Längen auf dem Zielfragment, gemessen von den Enden jeweils zur etwa mittig liegenden *tetO*-Sequenz. Vermutlich geschah der Abbruch durch die Polymerase aufgrund des palindromen Charakters des Operators.

Neben dem Plasmid wurde mit einem wesentlich längeren DNA-Fragment gearbeitet, einer modifizierten  $\lambda$ -DNA mit eingebautem *tetO*. Es stand ein DNA-Molekül zur Verfügung, das eine Konturlänge von 15,3  $\mu$ m (45,9 kbp) hat und zwei hintereinander liegende *tet*-Operatoren trägt.

Bei den TetR-Proteinen wurden zwei grundsätzlich verschiedene Proteine genutzt. Es handelte sich zum einen um den einfachen TetR in der cysteinfreien Variante BD mit einem Molekulargewicht des Dimers von 46 kDa (Abbildung 4.2) [HIN]. Cysteinfreie TetR haben den Vorteil, dass keine unbeabsichtigten Verknüpfungen infolge der Oxidation von SH-Gruppen auftreten können.

Zur Verbindung von zwei DNA-Strängen wurde ein modifiziertes TetR-Protein verwendet, das *scTetRtD<sub>L</sub>* (*single-chain-TetR-trans-Dimerizer-LexA* [KRU, AME], cysteinfreie Variante noch nicht veröffentlicht). Wie in Abbildung 4.3 dargestellt, besitzt dieses Protein C-terminal zusätzlich eine LexA-Dimerisierungsdomäne, über die jeweils zwei Monomere so miteinander verknüpft werden, dass das Protein gleichzeitig an zwei *tet*-Operatoren binden und so zwei DNA-Moleküle miteinander verbinden kann. Das nun 66 kDa schwere Monomer wird außerdem stabilisiert, indem die beiden Untereinheiten mit einer Aminosäurekette fest miteinander verbunden sind.



**Abb. 4.3:** Übersicht über die verwendeten Tet-Repressor-Proteine.

**A)** Dimer des einfachen TetR.

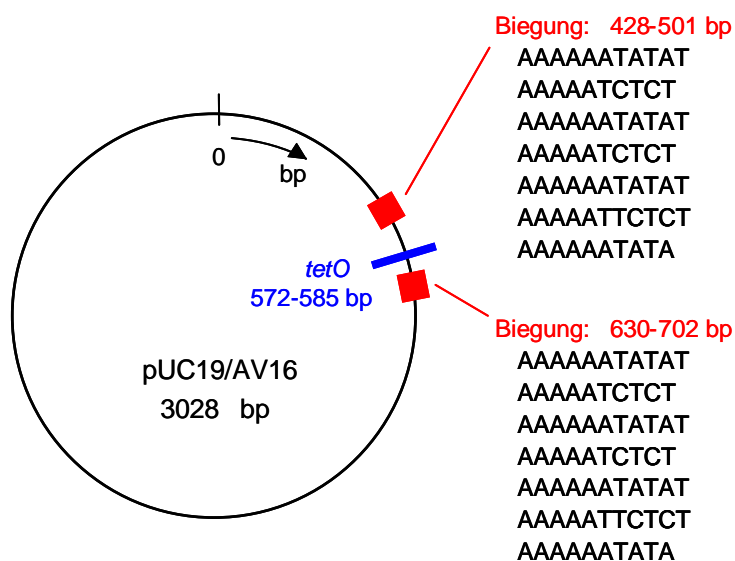
**B)** Monomer des *scTetRtD<sub>L</sub>* mit LexA-Dimerisierungsdomäne und zusätzlicher Aminosäurekette zur Stabilisierung des Monomers.

**C)** Dimer des *scTetRtD<sub>L</sub>* verbindet zwei DNA-Stränge miteinander (nach [KRU, MAJ]).

### 4.3 Das Plasmid pUC19/AV16 - Besonderheiten bei der Elektrophorese

EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*) ist eine Methode zum Nachweis der Bindung des Tet-Repressors an die DNA. Dabei wird ausgenutzt, dass Protein-DNA-Komplexe während der Elektrophorese unter gleichen Bedingungen langsamer durch das Gel migrieren als freie DNA. So entsteht ein *Shift* zwischen den Banden von gebundener und ungebundener DNA.

Es gibt aber auch andere Ursachen für Laufverzögerungen im Gel, nämlich solche, die von Konformationsänderungen der DNA herrühren. So kann es durch die Bindung eines Proteins zu einer proteininduzierten Biegung kommen. Die Bindung an TetR führt zu einer leichten Biegung (siehe Abbildung 4.2), diese ist aber hier nicht von Bedeutung. Eine wesentlich größere Rolle spielt bei dem verwendeten Plasmid pUC19/AV16 eine sequenzinduzierte Biegung. Wie in Abbildung 4.4 dargestellt ist, besitzt das Plasmid an zwei Positionen rechts und links von *tetO* bestimmte Nukleotidfolgen, die für eine starke Biegung verantwortlich sind.

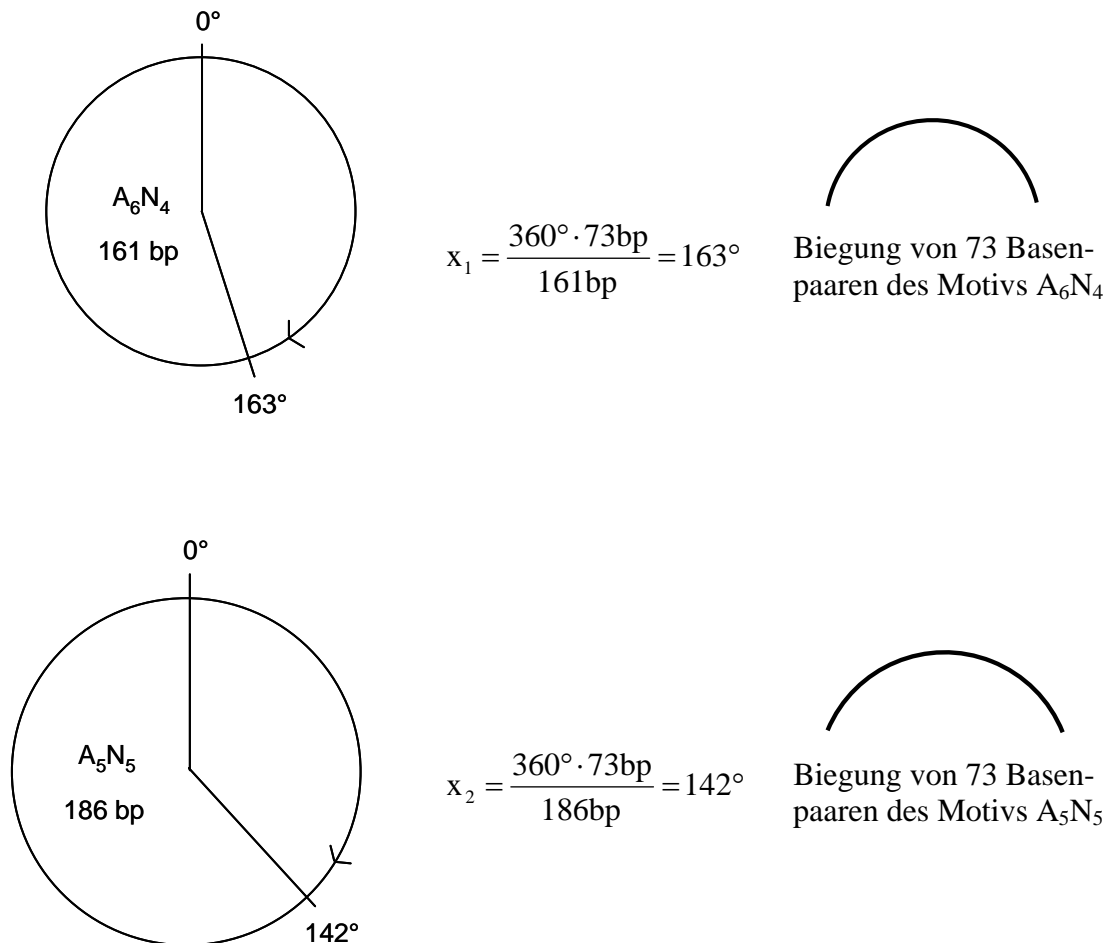


**Abb. 4.4:** Das Plasmid pUC19/AV16 besitzt an zwei Positionen Nukleotidfolgen, die starke Biegungen bedingen. Der DNA-Strang ist an diesen Stellen lokal versteift.

Aus kristallografischen Untersuchungen ist bekannt, dass Folgen von mehreren Adenin-Nukleotiden zu einer veränderten Struktur führen. Eine Helixwindung enthält statt 10,5 nur noch 10 Basenpaare, die kleine Furche ist schmaler als in der Standard-B-Form der DNA, und es kommt zur Ausbildung von zusätzlichen Wasserstoffbrücken zwischen dem Adenin eines Basenpaares und dem Thymin des benachbarten Basenpaares [KNI 2]. Wiederholen sich, wie hier beim pUC19/AV16, solche Adeninblöcke in Abständen einer Helixwindung (aller 10 bis 11 Basenpaare), dann heben sich die Einzelbiegungen nicht auf, sondern sie weisen in eine Richtung und summieren sich zu einer starken Krümmung auf.



Zur Ermittlung des Biegewinkels gibt es verschiedene Modelle, so das *Zhurkin-Modell* [ZHU], das *Wedge-Modell* von *Trifonov* [TRI] und das Modell von *de Santis* [SCI].



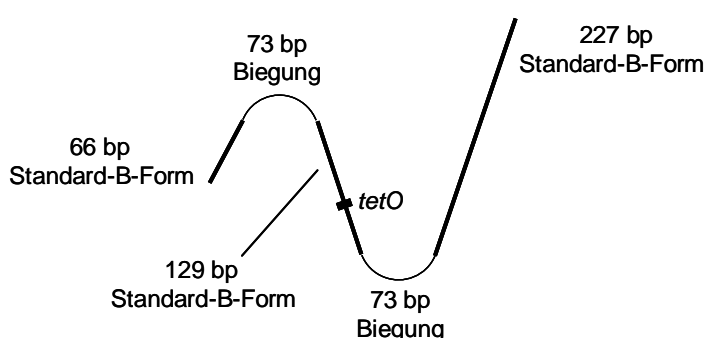
**Abb. 4.5:** Berechnung des Biegewinkels für die 73 bp langen gebogenen Sequenzen des Plasmides pUC19/AV16. Grundlage ist eine Rechnung nach dem *Junction-Modell* nach *KOO et al.* [KOO] zur Ermittlung der Anzahl an Basenpaaren, die durch die Krümmung der Motive  $A_6N_4$  und  $A_5N_5$  einen DNA-Strang zu einem geschlossenen Kreis führt.

Um die Biegungen bei dem hier verwendeten Plasmid veranschaulichen zu können, soll eine Arbeit von *Koo* und *Crothers* herangezogen werden, die ebenfalls *A-Tracts* mit fünf- bzw. sechsmal Adenin pro Helixwindung ( $A_5N_5$ ;  $A_6N_4$ ) untersucht haben [KOO]. Es wird hier mit dem *Junction-Modell* gerechnet, bei dem die Biegung durch Roll- und Kippwinkel zwischen den Helixachsen des *A-Tracts* und der normalen B-DNA charakterisiert wird. Der Biegewinkel für einen  $A_6$ -Tract wird mit ca.  $22^\circ$  angegeben. Es wird nun ermittelt, wie viele Basenpaare notwendig sind, um mit einer bestimmten Sequenz und Krümmung einen vollständigen Kreis darstellen zu können. Für das  $A_6N_4$ -Motiv werden 161 Basenpaare gebraucht, beim  $A_5N_5$ -Motiv ist die Krümmung weniger stark, der Kreis umfasst 186



Basenpaare. Beim Plasmid pUC19/AV16 bestehen beide Biegungen jeweils aus 73 Basenpaaren, die Motive  $A_5N_5$  und  $A_6N_4$  treten abwechselnd auf. Es ist nun möglich, aus den beschriebenen Angaben zu den  $360^\circ$ -Krümmungen die Winkel für die gebogenen Stellen innerhalb des Plasmides auszurechnen (Abbildung 4.5). 73 Basenpaare der beiden Motive führen zu einem Biegewinkel von  $163^\circ$  bzw.  $142^\circ$ .

Da im pUC19/AV16 die Krümmung nicht von einem Sequenzmotiv bestimmt wird, sondern die beiden Motive im Wechsel auftreten, wird der Winkel zwischen den Werten von  $142^\circ$  und  $163^\circ$  liegen. Es ist außerdem eine Abschätzung über den Biegewinkel eines  $A_6$ -Tracts möglich: Sieben Tracts mit  $22^\circ$  Biegung summieren sich zu einer Gesamtbiegung von  $154^\circ$ . Untersuchungen von *Niederweis et al.* [NIE] an einem DNA-Segment, das auch alternierend vier  $A_6$ -Tracts und drei  $A_5$ -Tracts aufweist, ergeben ebenfalls einen Winkel in dieser Größenordnung:  $140^\circ$ . Bei einem verwendeten 568 bp-Fragment aus dem Plasmid, das beide Krümmungen enthält, nimmt die Strukturveränderung ca. ein Viertel der Moleküllänge ein. Auf dieser Länge ist das Molekül versteift, was Auswirkungen auf die Mobilität während der Elektrophorese haben wird. Abbildung 4.6 zeigt eine mögliche Konformation dieses Fragmentes, die einige theoretische Annahmen voraussetzt. Die berechneten Krümmungen wurden mit dem *Junction*-Modell ermittelt. Außerdem geht die Skizze davon aus, dass sich das Molekül in einer Ebene befindet. Die gebogenen Teile können aber im Raum in andere Richtungen gedreht werden. Diese Drehungen hängen wiederum davon ab, welche Flexibilität die Nukleotidfolgen zwischen den gekrümmten Sequenzen haben und wie viele Helixwindungen sich daraus ergeben.

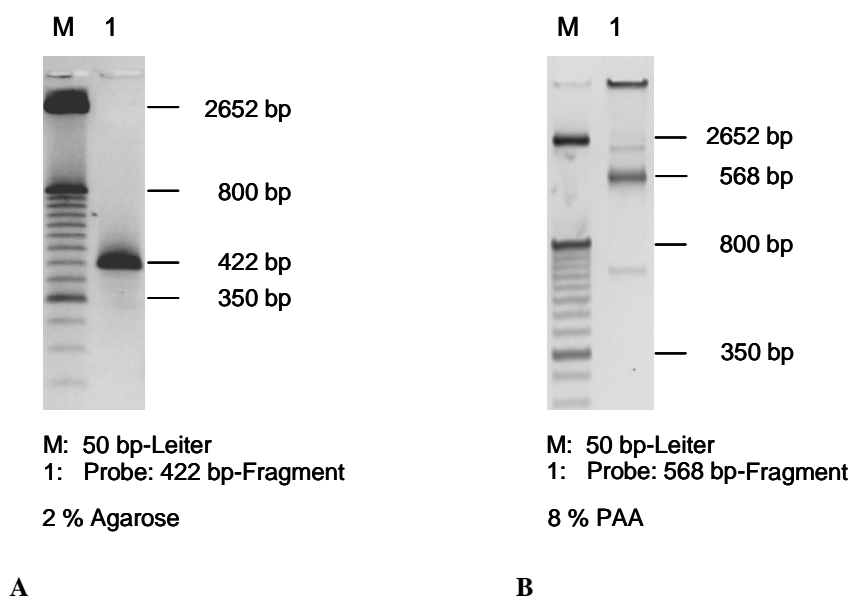


**Abb. 4.6:** Eine mögliche Konformation des 568 bp-Fragmentes. Sie hängt von den Annahmen des Modells zur Berechnung der Biegungen sowie der Flexibilität und Anzahl der Helixwindungen der nicht gebogenen Sequenzen ab.

In Polyacrylamidgelen kann aufgrund des höheren Auftrennungsvermögens gegenüber Agarosegelen das abnorme Laufverhalten von gebogenen DNA-Molekülen beobachtet werden. Im Vergleich zu Fragmenten mit „normaler“ Basenfolge und gleicher Länge laufen diese Moleküle stark verzögert. Mit steigender Gelstärke nehmen diese

Laufunterschiede noch zu. Wegen des gebogenen Rückgrates scheint es so, als hätten diese Moleküle einen größeren Durchmesser und benötigten deshalb größere Poren in der Gelmatrix [STE]. In der Literatur sind verschiedene empirische Gleichungen bekannt, um eine DNA-Biegung der Größe der Laufverzögerung unter bestimmten Elektrophoresebedingungen zuordnen zu können [KOO, ROS]. Dabei ist die Laufverzögerung eine quadratische Funktion der Krümmung des DNA-Moleküls und nimmt außerdem mit der Länge der gebogenen Sequenzen innerhalb des Moleküls zu.

Um festzustellen, wie sich die sequenzinduzierten Biegungen des Plasmides pUC19/AV16 bei der Elektrophorese auswirken und um diese Laufanomalien von den durch Proteinbindung hervorgerufenen *Shifts* unterscheiden zu können, wurden sowohl Fragmente des Plasmides als auch das gesamte Plasmid in Abwesenheit von TetR elektrophoretisch untersucht. Zunächst wurden kurze Fragmente aus dem Plasmid hergestellt, die einen oder beide der 73 bp langen adeninreichen Blöcke enthielten. Ein 422 bp-Fragment reichte von Basenpaar 183 bis 604 und enthielt einen 73 bp langen adeninreichen Block, ein 568 bp-Fragment zeigte von Basenpaar 362 bis 929 und schloss beide gekrümmte Nukleotidfolgen ein. Während der Elektrophorese dieser Moleküle wurden Unterschiede im Laufverhalten in Abhängigkeit von der Gelart sichtbar. Im Agarosegel liefen die Fragmente entsprechend ihrer Länge ohne Verzögerung (Abbildung 4.7A). In einer engmaschigeren Polyacrylamidgelmatrix dagegen wurden, wie erwartet, starke Laufverzögerungen gegenüber den nicht gebogenen Molekülen des Markers festgestellt. Die Bande des 568 bp-Fragmentes lag z. B. zwischen denen des Markers mit 2652 und 800 bp (Abbildung 4.7B). Das erwartete abnorme Laufverhalten in hochprozentigen PAA-Gelen konnte bei den kurzen Fragmenten nachgewiesen werden.

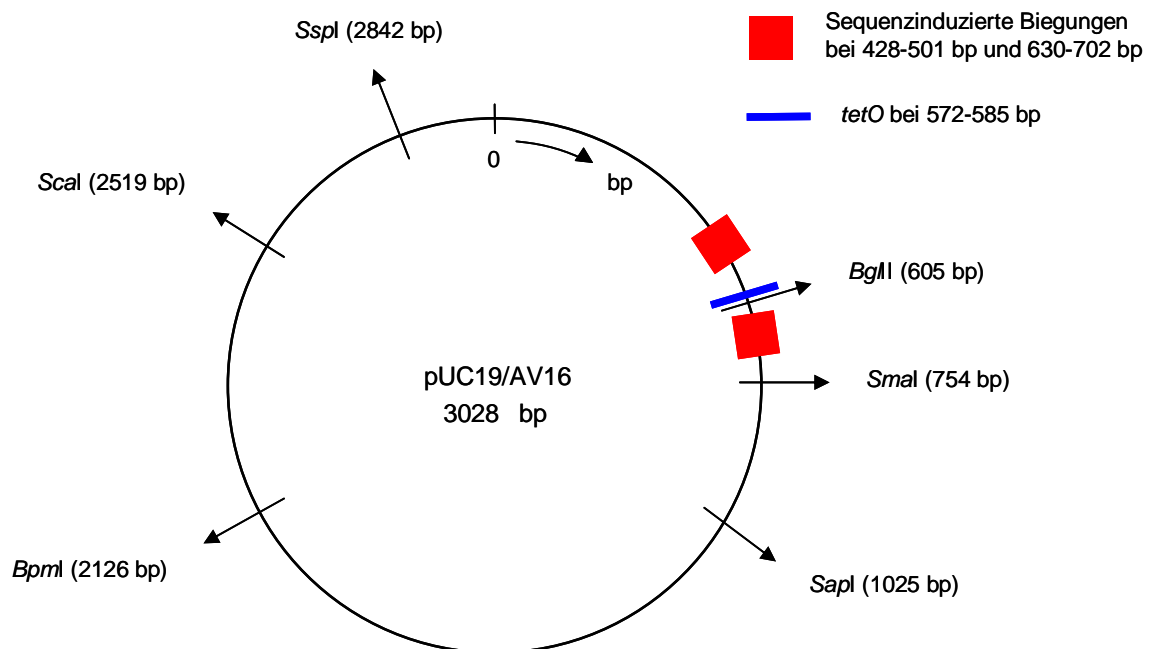


**Abb. 4.7:** Laufverhalten von kurzen, sequenzinduziert gebogenen Fragmenten im Gel.

**A)** Im Agarosegel tritt keine Laufverzögerung auf, das Fragment läuft entsprechend seiner Länge korrekt.

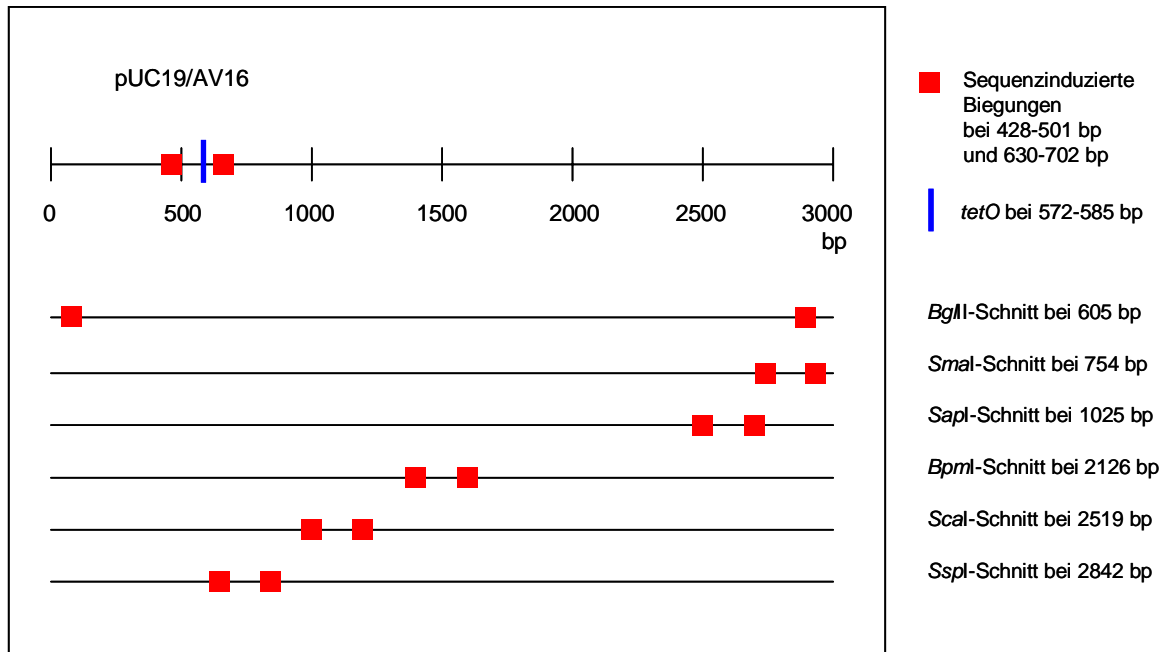
**B)** Im PAA-Gel kommt es zur starken Laufverzögerung, ein Vergleich mit den Banden des Markers ist nicht möglich.

Die Untersuchung des Laufverhaltens des gesamten Plasmides brachte ebenfalls interessante Ergebnisse. Die Plasmide wurden an einer Stelle aufgetrennt, sie waren somit alle gleich lang und enthielten die beiden gekrümmten Abschnitte, die nun etwa 5 % der Gesamtmoleküllänge ausmachten. Im Hinblick auf das spätere Verknüpfen von zwei DNA-Strängen mit dem TetR und die damit verbundene Forderung nach dem Aufbau unterschiedlicher Strukturen wurde das Plasmid mit verschiedenen Restriktionsenzymen so linearisiert, dass die *tetO*-Sequenz an verschiedenen Positionen innerhalb des Moleküls lag. Da sich die beiden gekrümmten Sequenzabschnitte mit einem Abstand von 44 bzw. 72 Basenpaaren rechts und links nahe des *tetO* befanden, wurden diese ebenfalls an verschiedenen Stellen platziert. Die sechs verwendeten Restriktionsenzyme und die Lage deren Schnittstellen sind in Abbildung 4.8 dargestellt.



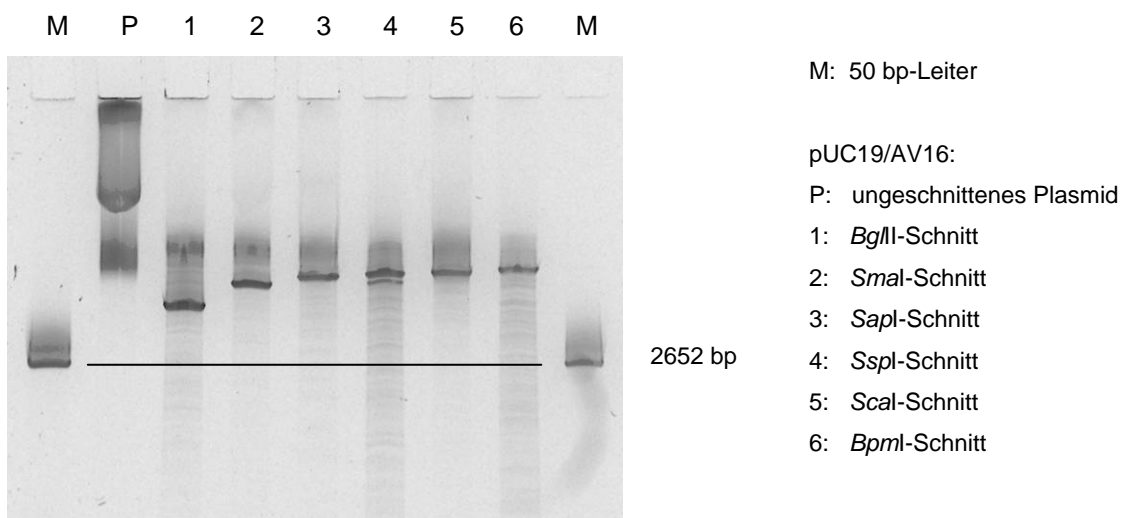
**Abb. 4.8:** Schnittstellen der zur Linearisierung des Plasmides pUC19/AV16 verwendeten Restriktionsenzyme.

Abbildung 4.9 zeigt die entstandenen linearisierten Moleküle mit den jeweiligen Positionen der Biegungen. Das Enzym *BglI* schneidet nahe an *tetO*, so dass die gebogenen Bereiche nun an den Enden der DNA lagen. Die weiteren Schnittstellen wurden so ausgewählt, dass die versteiften Sequenzabschnitte schrittweise weiter in Richtung Molekülmitte rückten. Nach Verdau mit *BpmI* lagen die Krümmungen in der Mitte der Moleküle.



**Abb. 4.9:** Lage der sequenzinduzierten Biegungen im linearisierten Plasmid pUC19/AV16.

Bei der Elektrophorese im PAA-Gel zeigte sich, dass es große Unterschiede in der Mobilität zwischen den verschiedenen geschnittenen Molekülen gab (Abbildung 4.10). Die Lage der Biegungen wirkte sich deutlich auf das Laufverhalten aus. Befanden sich die beiden gekrümmten Sequenzen in der Molekülmitte, trat die größte Laufverzögerung auf, während die Moleküle mit den Biegungen an den beiden Enden am schnellsten durch die Gelmatrix wandern konnten. Die Formen der durch den Verdau entstandenen Moleküle sollten hier keinen Einfluss haben, denn es entstanden bei drei Enzymen *blunt ends* und bei den *sticky ends* maximal 4 bp-Überhänge.



**Abb. 4.10:** Vergleich der Mobilitäten im Gel von linearisierten Plasmiden pUC19/AV16 in Abhängigkeit von der Lage der Biegungen im Molekül. Die Laufverzögerung nimmt zu, je weiter die Biegungen in Richtung Molekülmitte rücken. Gelstärke: 6 % PAA, Spannung: 120 V, Zeit: 3,5 h.

---

Als Resultat der elektrophoretischen Untersuchungen des Plasmides pUC19/AV16 konnte festgehalten werden, dass durch die adeninreichen Nukleotidfolgen deutliche Laufverzögerungen in PAA-Gelen auftraten. Diese Laufverzögerungen waren außerdem von der Lage der *A-tracts* innerhalb des Moleküls abhängig. Welche Konformation DNA-Moleküle bei der Bewegung durch das Gel im elektrischen Feld tatsächlich einnehmen, ist bisher nicht bekannt. Es gibt verschiedene Theorien, das wirkliche Verhalten wird eine "Mischung" daraus sein. Eine Annahme ist, dass DNA in globulärer Form durch die Gelmatrix wandert, wobei die Größe des Moleküls durch den Kugeldurchmesser bestimmt wird. Eine andere Theorie geht davon aus, dass die Moleküle sich im elektrischen Feld ausrichten und in gestreckter Form durch die Poren der Matrix migrieren [LOT]. Für beide Varianten ist vorstellbar, dass sich gebogene und versteifte Molekülabschnitte laufverzögernd auswirken. Da für nachfolgende Nachweise von Proteinbindungen die Verwendung der engmaschigen PAA-Gele Voraussetzung ist, sind Kenntnisse über das abnorme Laufverhalten der Fragmente notwendig. Für vergleichende Experimente sollten stets mit dem gleichen Enzym geschnittene Plasmide genutzt werden.

## 4.4. Anbindung des einfachen TetR-Proteins an die DNA

### 4.4.1 Nachweis im Gel

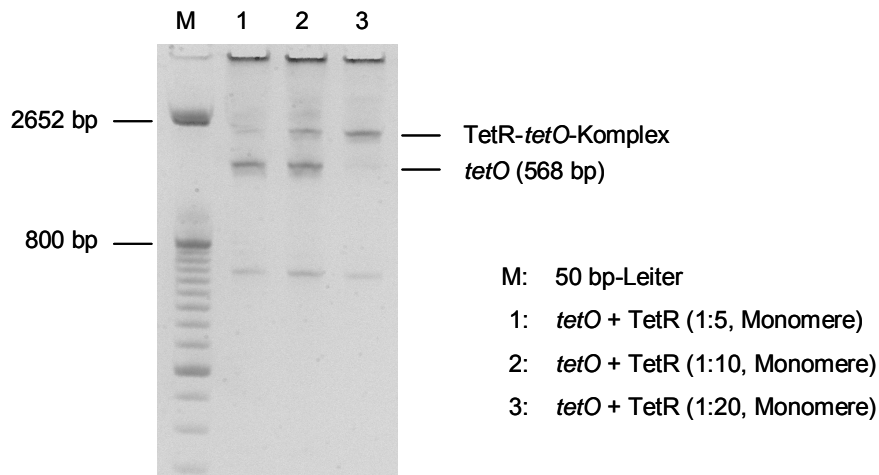
Der Nachweis der Bindung des TetR BD an die *tetO*-Sequenz der DNA wurde mittels *Shift*-Experiment im Polyacrylamidgel geführt. Bei dieser Gelelektrophorese migrieren die negativ geladenen DNA-Moleküle und Proteine in Abhängigkeit von ihrer Größe, Ladung und Konformation im elektrischen Feld in Richtung Anode. Komplexe aus DNA und Protein laufen aus mehreren Gründen langsamer als ungebundene DNA:

- Zum einen wird durch die Proteinbindung die Masse vergrößert.
- Zum anderen spielt eine Rolle, dass durch die Bindung des zwar leicht negativ geladenen TetR nicht so viele negative Ladungen dazukommen, wie es bei gleichem Massezuwachs durch DNA der Fall wäre.
- Einen weiteren Beitrag zur Laufverzögerung kann die leichte Biegung des DNA-Rückgrates, die eine Folge der TetR-Bindung ist, leisten (siehe Abbildung 4.2).

So entstand als Ergebnis der Gelelektrophorese ein *Shift* zwischen den Banden von komplexierter und freier DNA, der die Bindung zwischen TetR und *tetO* anzeigt.

Alle Elektrophorese-Experimente wurden unter nicht denaturierenden Bedingungen durchgeführt, damit das Protein seine Funktions- und damit Bindefähigkeit behielt. Es wurde mit vergleichsweise kurzen, wenige 100 bp zählenden DNA-Fragmenten gearbeitet, weil diese sich in einem Polyacrylamidgel gut auftrennen lassen.

DNA und TetR wurden vor dem Auftragen auf das Gel 40 min in einer Pufferlösung mit Metallsalzen bei Raumtemperatur inkubiert. Abbildung 4.11 zeigt ein typisches Ergebnis eines *Shift*-Experimentes im PAA-Gel. Die Bande des 568 bp-Fragmentes verschiebt sich mit steigendem Proteinüberschuß, bis bei einem Molekülnzahlverhältnis von 1:20 (*tetO*:TetR) ein vollständiger *Shift* erreicht ist. Der Proteinüberschuss ist notwendig, da es sich bei dieser Bindung um eine Gleichgewichtsreaktion handelt, die konzentrationsabhängig ist (siehe Abschnitt 4.1).



**Abb. 4.11:** PAA-Gel zum Nachweis der TetR-*tetO*-Bindung an 568 bp-Fragmenten und dem einfachen TetR der Klasse BD mittels *Shift*. Die Intensität der TetR-*tetO*-Bande nimmt mit steigendem Proteinüberschuß zu, bis bei einem Molekülverhältnis von 1:20 (*tetO*: TetR) ein vollständiger Shift erreicht ist. Die Bande unterhalb der von *tetO* in den Spuren 1-3 wird von unspezifischer DNA verursacht. Die 568 bp-Fragmente laufen aufgrund der Biegungen nicht entsprechend dem Marker. Gelstärke: 8 % PAA, Spannung: 100 V, Zeit: 2 h, DNA-Färbung mit SYBR Green I.

Die ursprünglich favorisierte Pufferzusammensetzung

- 20 mM Tris/ 2,5 mM NaCl/ 5 mM MgCl<sub>2</sub> (pH 8) [SCH 3]

wurde aufgrund von Anforderungen an weiterführende Experimente, wie z. B. der Abbildung der Komplexe mit dem AFM, variiert. Mittels Elektrophorese konnte nachgewiesen werden, dass die TetR-*tetO*-Bindung ebenso in den folgenden Medien möglich ist und zu vollständigen *Shifts* führt:

- 10 mM HEPES/ 1 mM NiCl<sub>2</sub> (pH 7),
- 10 mM HEPES/ 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> (pH 7),
- NEB 4 (pH 7,9) und
- 10 mM Tris/ 1 mM EDTA (pH 8).

NaCl wurde im Anbindepuffer nicht verwendet, da durch Zugabe von NaCl die Affinität von TetR zu *tetO* aufgrund der Ladungsabschirmung vermindert wird.

Mit YOYO-1 markierte DNA konnte nicht vollständig in den DNA-Protein-Komplex überführt werden, da vermutlich schon geringe Markierungsraten im Bereich von 0,05 zu Konformationsänderungen im DNA-Molekül führen (siehe Abschnitt 2.5.1) und die Proteinbindung damit unterdrücken können. Die exakte „Passung“ des TetR-Dimers in der großen Furche ist aber Voraussetzung für die Bindung an *tetO*. Vom Induktionsvorgang des Proteins mit Tetrazyklin ist bekannt, dass eine Abstandsänderung der beiden Erkennungshelices um ca. 3 Å zur Lösung der TetR-*tetO*-Bindung führt. Es können also nur solche *tetO* eine Komplexierung eingehen, die keine YOYO-1-Moleküle gebunden haben.

Die Zugabe eines polyklonalen Antikörpers führte ebenfalls nur zu unvollständigen *Shifts* im Gel. Die Antikörpermischung enthält auch solche Proteine, die an den für die DNA-



Bindung notwendigen Aminosäuren des HTH-Bindemotivs des TetR binden und somit eine TetR-*tetO*-Bindung verhindern.

#### 4.4.2 Abbildung mittels Rasterkraftmikroskopie

Nachdem mit Gelelektrophorese ein Verfahren für den Nachweis der TetR-*tetO*-Bindung zur Verfügung stand, wurde nun eine Methode zur bildlichen Darstellung der Konstrukte gesucht. Wie bereits im Kapitel 3.4.1 dargelegt, ist die Raster- oder Atomkraftmikroskopie (AFM) aufgrund der lateralen Auflösung von 5 bis 10 nm für die Abbildung von einzelnen DNA-Molekülen und DNA-Protein-Komplexen an Luft ein geeignetes Abbildungsverfahren. Wegen der geringen mechanischen Beanspruchung der empfindlichen, biologischen Proben wurde im *Tapping Mode* gearbeitet. Für alle AFM-Proben in diesem Abschnitt 4 wurde Muskovit-Glimmer als Probenträger verwendet. Dieser Schichtkristall ist für das Scannen der nur etwa 1 nm hohen Moleküle besonders geeignet, da er auf Flächen von über 100  $\mu\text{m}^2$  atomar glatt ist. Außerdem ist er chemisch relativ inert [MUE].

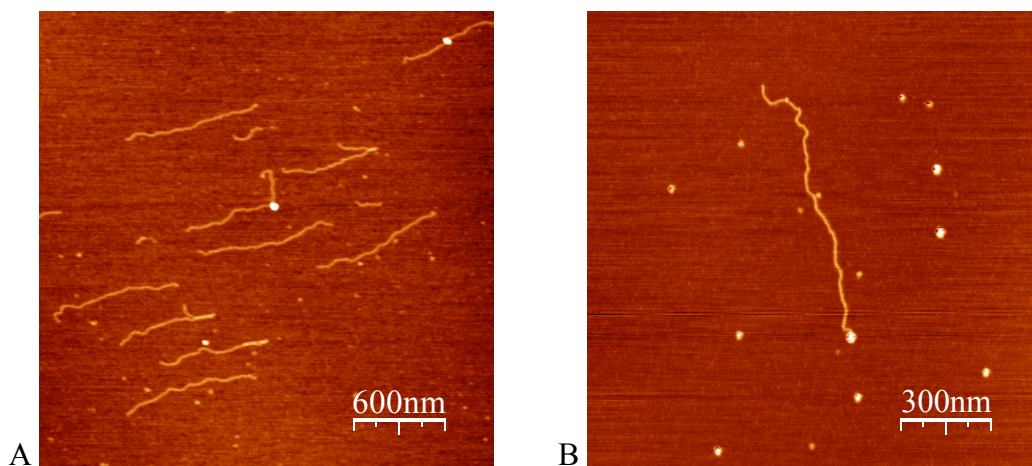
Die Adsorption der Proben auf dem Glimmer ist vom Salzgehalt und dem pH-Wert der Pufferlösung abhängig. Es musste ein Puffersystem verwendet werden, das für ausreichende Adsorption der Komplexe sorgt, aber dabei die DNA-Protein-Bindung nicht beeinflusst. Eine Lösung aus 10 mM HEPES und 1 mM  $\text{NiCl}_2$  bei pH 7 erwies sich als am besten geeignet. Da Glimmer eine negative Oberflächenladung besitzt und auch die Phosphatgruppen im DNA-Rückgrat negativ geladen sind, werden die zweiwertigen Kationen in der Lösung benötigt, um eine Ladungsbrücke zwischen DNA und Oberfläche zu formen und die Adsorption durch elektrostatische Wechselwirkung zu vermitteln. Es ist bekannt, dass verschiedene Metallionen, wie z. B.  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , diese Funktion erfüllen können. Untersuchungen von *Hansma et al.* [HAN] haben aber gezeigt, dass die Bindungsstärken sich unterscheiden und mit dem Ionenradius der Metallionen korrelieren.  $\text{Ni}^{2+}$  mit dem kleinsten Ionenradius der untersuchten Metalle von 0,69 Å vermittelt die stärkste Bindung zwischen DNA und Glimmer. Es werden dafür sterische Gründe vermutet, kleine Ionen können in den Kavitäten der Glimmeroberfläche adsorbieren.

Die eigenen Experimente bestätigten die Beobachtung von *Bezanilla et al.* [BEZ], dass die DNA-Adsorption in HEPES-Puffer stärker ist als in Tris-Puffer. Tris ist im neutralen pH-Bereich positiv geladen, was zu einer Behinderung der Bindung der Metallionen an DNA und Glimmer führen kann. HEPES besitzt dagegen heterozyklische Ringe sowie positiv und negativ geladene Gruppen, sodass verschiedene Wechselwirkungen zwischen DNA und Unterlage möglich sind. Der Puffer 10 mM HEPES/ 1 mM  $\text{NiCl}_2$  führt zu einer relativ

starken Adsorption, bei der neben einer Abbildung an Luft auch eine solche in Flüssigkeit möglich ist.

Es ist außerdem bekannt, dass verschieden starke Adsorption, also der Übergang von einem dreidimensionalen Molekül in Lösung zu einem zweidimensionalen Molekül auf der Oberfläche, zu unterschiedlich starker Knäuelbildung der DNA führt. Dabei können sich die Moleküle auf der Oberfläche im Gleichgewicht befinden, wie in einer idealen zweidimensionalen Lösung, oder aber auf der Oberfläche Konformationen einnehmen, die einfachen Projektionen auf die Ebene entsprechen [RIV].

Abbildung 4.12 zeigt zwei AFM-Aufnahmen von Komplexen aus an verschiedenen Positionen geschnittenen Plasmiden pUC19/AV16 und dem angebundenen TetR-Protein.



**Abb. 4.12:** AFM-Aufnahmen von Komplexen aus mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnittenen Plasmiden pUC19/AV16 und gebundenem TetR. Zur optischen Vergrößerung des Proteins wurde ein polyklonaler Anti-TetR ergänzt und der Proteinkomplex mittels Glutaraldehyd auf der DNA fixiert. Die Konturlänge eines Plasmides beträgt ca. 1  $\mu\text{m}$ .

**A)** Verdau des Plasmides mit *ScaI*, *tetO* befindet sich bei ca.  $\frac{1}{3}$  der Moleküllänge.

**B)** Verdau des Plasmides mit *SmaI*, *tetO* befindet sich nahe dem Molekülende.

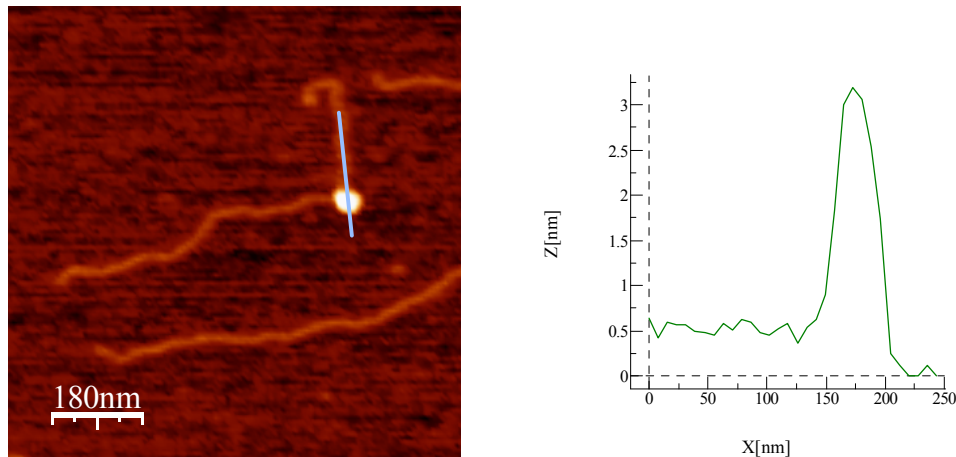
Die Lage der *tetO*-Sequenzen beim *ScaI*-Schnitt bei ca.  $\frac{1}{3}$  der Moleküllänge (Teilbild A) und beim *SmaI*-Schnitt ca. 200 Basenpaare vom Molekülende entfernt (Teilbild B, siehe Abschnitt 4.4) wird durch die Position der gebundenen Proteine bestätigt. Damit die einfachen TetR-Proteine so deutlich zu sehen waren, wurden sie durch zusätzliches Anbinden eines Antikörpers (polyklonaler Anti-TetR, ca. 150 kDa) optisch vergrößert. Der dadurch entstandene vermehrte Proteinüberschuss wurde durch Filtern und Zentrifugieren (PCR-Aufreinigungs-Kit QIAquick, QIAGEN) abgetrennt. Da es sich bei der TetR-*tetO*-Bindung um eine konzentrationsabhängige Gleichgewichtsreaktion handelt, musste vor der Abtrennung des ungebundenen Proteins das gebundene mit der DNA zusätzlich vernetzt werden. Ansonsten würde mit einer Verringerung der Proteinkonzentration auch die Zahl

der gebundenen Proteine reduziert. Entsprechend den Erfahrungen von *Keren et al.* [KER] wurde zur Fixierung von TetR und Anti-TetR auf der DNA die DNA-Protein-Lösung mit 0,2-prozentiger Glutaraldehydlösung ( $C_5H_8O_2$ ) inkubiert und damit die Aminogruppen von DNA und Proteinen miteinander vernetzt.

Im Teilbild A wird deutlich, dass nicht an allen DNA-Molekülen Proteine positioniert sind, obwohl durch Gelelektrophorese die Bindung aller DNA-Moleküle gezeigt werden konnte. Eine mögliche Ursache kann in der mechanischen Beanspruchung der Moleküle bei der Probenpräparation liegen. Damit der Ort der Proteinbindung genau lokalisiert werden konnte, mussten die DNA-Moleküle auf dem Glimmer in gestreckter und nicht verknäuelter Form abgelegt werden. Die dafür notwendige Kraft wurde aufgebracht, indem die DNA in einem größeren Puffervolumen mit einer Pipette über die Glimmeroberfläche gespült wurde. Die DNA-Moleküle wurden dabei durch *Molecular Combing* ausgekämmt. Zuvor wurde nämlich beobachtet, dass die Moleküle bei Adsorption auf der Glimmeroberfläche aus einem stehenden Tropfen nur dann annähernd gestreckt sind, wenn sie eine bestimmte Länge nicht überschreiten oder eine gewisse Steifigkeit haben. Die 568 bp-Fragmente sind kurz genug, die geschlossenen Plasmide pUC19/AV16 haben eine ausreichend hohe Steifigkeit. Die aufgetrennten Plasmide dagegen adsorbierten in verknäuelter Konformation und mussten deshalb durch Aufbringen einer äußeren Kraft gestreckt werden. Möglicherweise sind damit lokale Dehnungen verbunden, die Ursache für ein Abdissoziieren des Proteins sind.

Einen anderen Grund stellt die Verwendung des Antikörpers dar. Da der einzige verfügbare monoklonale Anti-TetR (TET03 Anti-TetRepressor, monoklonal Maus IgG1 der Firma MoBiTec) an der DNA-Binderegion des TetR bindet, wurde ein polyklonaler Anti-TetR verwendet, der aber zum Teil auch an dieser Region bindet und somit TetR-Proteine blockiert. Das Fixiermittel Glutaraldehyd führte wohl durch ungewollte Vernetzungen von Proteinen in der Lösung ebenfalls zu "Verlusten".

In Abbildung 4.13 wird ein Ausschnitt aus Abbildung 4.12 A mit dem dazugehörigen Höhenprofil, gemessen entlang der Markierung, gezeigt. Die DNA-Höhe betrug im trockenen Zustand der Probe nur noch 0,5-0,7 nm, das entspricht weniger als der Hälfte des Durchmessers im nativen Zustand. Das mit 46 kDa relativ kleine TetR-Dimer, das sich zudem in die große Furche der Helix legt, war bei aufgetrockneter Probe auch durch eine Höhenmessung nicht eindeutig zu identifizieren. Erst infolge des Anbindens eines ca. 150 kDa großen Antikörpers konnten die Proteine mit einer Höhe von nun ca. 3 nm deutlich sichtbar gemacht werden.



**Abb. 4.13:** Darstellung eines Höhenprofils von DNA und gebundenen Proteinen (Markierung) an einer rasterkraftmikroskopischen Aufnahme einer Probe in trockenem Zustand.

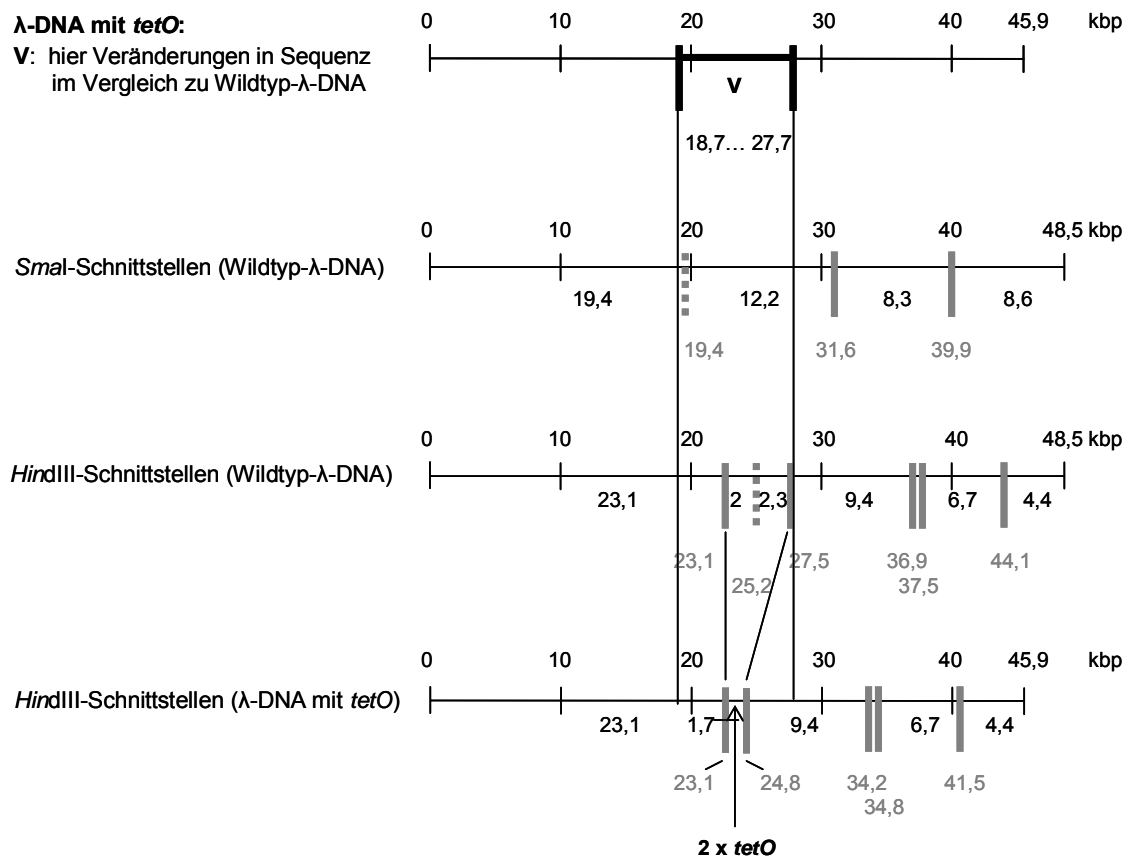
#### 4.4.3 Bindung von TetR an $\lambda$ -DNA mit *tetO* und Analyse der Lage von *tetO* auf der DNA

Für den Aufbau von DNA-Netzwerken auf Kontaktstrukturen werden Moleküle mit *tetO* benötigt, die eine größere Länge als das Plasmid pUC19/AV16 (ca. 1  $\mu\text{m}$ ) haben.  $\lambda$ -DNA mit einer Konturlänge von 16,1  $\mu\text{m}$  bietet sich dafür an, besitzt aber als Wildtyp kein *tetO*. Von der Arbeitsgruppe von Prof. W. Hillen am Institut für Mikrobiologie der Universität Erlangen-Nürnberg wurde eine modifizierte  $\lambda$ -DNA zur Verfügung gestellt, die zwei *tetO*-Sequenzen in einem Abstand von 43 bp trägt. Die genaue Lage der beiden *tetO* auf dieser  $\lambda$ -*tetO*-DNA war nicht bekannt, konnte lediglich durch den Bereich von 18,7-27,7 kbp eingegrenzt werden. Um die  $\lambda$ -*tetO*-DNA für ihren zukünftigen Einsatz in Netzwerken zu charakterisieren, mussten die Positionen von *tetO* bestimmt und die Bindung an TetR nachgewiesen werden.

Dazu wurde  $\lambda$ -*tetO*-DNA mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut und die entstandenen Fragmente mit den bekannten Fragmentlängen für  $\lambda$ -DNA mittels Elektrophorese verglichen. Da in der modifizierten DNA im gesamten Bereich zwischen 18,7 kbp und 27,7 kbp die Sequenz variiert worden war, konnte so das Fehlen oder eine Veränderung von Schnittstellen festgestellt werden. Nach der Inkubation mit TetR wurde im Gel nach verzögert laufenden Fragmenten gesucht. Bei diesem Verfahren konnte es sich nur um ein schrittweises „Herantasten“ handeln, denn für den Nachweis der TetR-*tetO*-Bindung ist eine genaue Einstellung der Konzentrationen von DNA und Protein notwendig. Da vorerst unbekannt war, welches der Fragmente den *Shift* zeigen wird, konnte die Proteinmenge nur für jeweils ein Fragment festgelegt werden. Ein zu hoher Proteinüberschuss führt zu unspezifischer Bindung an der DNA, mit einer zu geringen

Proteinkonzentration ist kein eindeutiger *Shift* zu zeigen. Außerdem wurde durch Variation von Gelart (Agarose oder PAA) und Gelstärke das Laufverhalten von kurzen oder langen Fragmenten und deren *Shifts* beeinflusst.

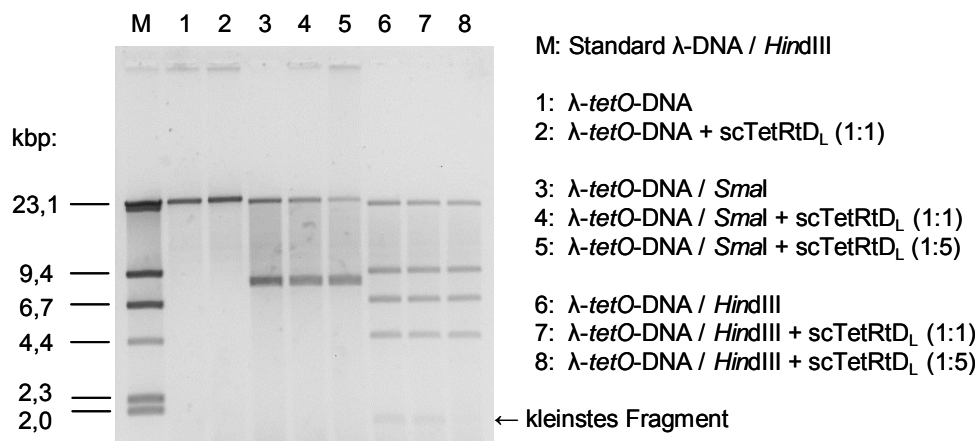
In Abbildung 4.14 sind  $\lambda$ -DNA und  $\lambda$ -*tetO*-DNA mit der Lage ihrer spezifischen Schnittstellen schematisch dargestellt. Die Suche nach *tetO* konzentrierte sich auf den mit „V“ gekennzeichneten Bereich.



**Abb. 4.14:** Vorgehensweise bei der Fragmentierung von  $\lambda$ -*tetO*-DNA und  $\lambda$ -DNA (Wildtyp) auf der Suche nach den beiden *tetO*-Sequenzen auf  $\lambda$ -*tetO*-DNA im Bereich von „V“. Enzymschnittstellen sind als graue Balken dargestellt. Durchgehende Linien bezeichnen Schnittstellen, die in beiden DNA existent sind. Schnittstellen mit durchbrochenen Linien sind auf der  $\lambda$ -*tetO*-DNA nicht vorhanden. Die Zahlen benennen die Lagen der Schnittstellen und die Längen der entstehenden Fragmente in kbp. *tetO* wurde im Bereich zwischen 23,1 kbp und 24,8 kbp lokalisiert.

Beim Verdau von  $\lambda$ -*tetO*-DNA mit *Sma*I entstanden nur drei Fragmente und nicht, wie bei  $\lambda$ -DNA, vier. Die Schnittstelle bei 19,4 kbp existierte nicht. Im Gel sind die beiden 8 kbp-Fragmente und ein großes Fragment zu sehen, dessen Länge zwischen der der gesamten DNA und der des größten Fragments beim *Hind*III-Schnitt liegt (Abb. 4.15). Dieses größte Fragment zeigte nach der scTetRtD<sub>L</sub>-Zugabe den Shift (Spur 5). Die durch die Bindung des doppelten TetR entstandenen sehr großen DNA-Protein-Komplexe konnten nicht in das Gel einlaufen. Die Spuren 3; 4 und 5 im Gelbild zeigen diesen Sachverhalt durch Abnahme der Intensität der größten Bande mit zunehmender Proteinmenge und Ansteigen

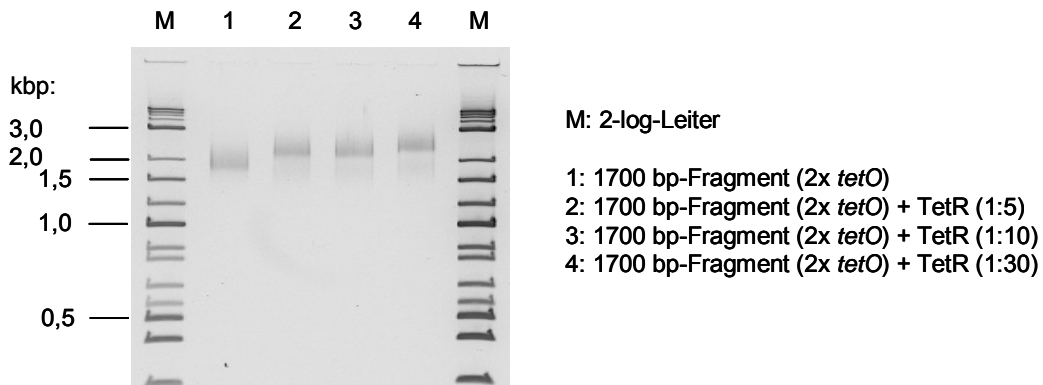
der DNA-Konzentration in den Taschen des Gels. Dieses Ergebnis demonstrierte, dass TetR an der  $\lambda$ -*tetO*-DNA bindet, die Lage der Bindestellen war aber noch nicht bekannt. Es wurde nun ein weiteres Restriktionsenzym ausgewählt, das den interessierenden Bereich „V“ zerlegen kann. Nach dem Verdau mit *Hind*III wurde festgestellt, dass nur fünf Fragmente anstatt der sechs bei der Wildtyp-DNA entstanden. Ein jeweils zusätzliches, 500 bp kleines Fragment war aufgrund zu geringer Konzentration im Gel nicht zu sehen und hatte hier auch keine Bedeutung. Wichtig dagegen war, dass es statt der beiden 2,0 und 2,3 kbp langen Fragmente nur ein kleineres Fragment gab (Abb. 4.14). Da die Größen der vier großen Fragmente genau denen von  $\lambda$ -DNA entsprachen, wurde geschlussfolgert, dass  $\lambda$ -*tetO*-DNA um einige kbp kürzer ist als  $\lambda$ -DNA. Mit zunehmender Zugabe von scTetRtD<sub>L</sub> wurde die Intensität der kleinsten Bande schwächer (Spuren 6-8), bis sie in Spur 8 nicht mehr zu erkennen war. Das Verschwinden der Bande kann mit der für dieses Fragment viel zu hohen Proteinkonzentration, die entsprechend des größten Fragmentes eingesetzt wurde, erklärt werden. Es kommt neben der spezifischen zu unspezifischer Proteinbindung, sodass die unterschiedlich großen Moleküle nicht mehr in einer Bande laufen. Die kleinste Bande zeigt ohnehin schon die schwächste Intensität, da sie die geringste DNA-Konzentration enthält. Da bei den anderen Banden kein *Shift* beobachtet wurde und auch keine großen Komplexe in den Geltaschen hängen blieben, wurde vermutet, dass die *tetO*-Sequenzen sich auf dem kleinen Fragment befinden. Dieses *tetO*-tragende Fragment sollte sich an die *Hind*III-Schnittstelle bei 23,1 kbp anschließen, die auch auf der  $\lambda$ -*tetO*-DNA vorhanden ist (Abb. 4.14).



**Abb. 4.15:** Agarosegel zur Analyse der Lage von *tetO* auf  $\lambda$ -*tetO*-DNA. Mit zunehmender Konzentration an scTetRtD<sub>L</sub> nehmen bei *Sma*I-verdauter  $\lambda$ -*tetO*-DNA die Menge des größten Fragmentes ab und die DNA-Menge in den Taschen des Gels zu. Bei *Hind*III-verdauter  $\lambda$ -*tetO*-DNA nimmt die Konzentration des kleinsten Fragmentes (< 2,0 kbp) ab. Zusammengenommen führen diese Indizien zu der Schlussfolgerung, dass sich *tetO* zwischen 23,1 und 24,8 kbp auf der  $\lambda$ -*tetO*-DNA befinden muss (siehe Abbildung 4.14). Bei der Berechnung der Proteinmengen wurden Fragmentlängen von 19,4 kbp (*Sma*I) bzw. 23,1 kbp (*Hind*III) vorausgesetzt, da ursprünglich ein *Shift* der jeweils größten Fragmente vermutet wurde. Gelstärke: 0,5% Agarose, Spannung: 80V, DNA-Färbung mit SYBR Green I.



Um die TetR-*tetO*-Bindung an  $\lambda$ -*tetO*-DNA nachweisen zu können, wurde das kleine Fragment aus dem Agarosegel eluiert und damit isoliert. Anschließend wurde die Fragmentlänge anhand eines DNA-Standards bei der Elektrophorese mit ca. 1700 bp bestimmt. Damit konnte die Proteinkonzentration für das *Shift*-Experiment mit TetR exakt berechnet werden. Das Ergebnis der TetR-*tetO*-Bindung ist im Gelbild in Abbildung 4.16 dargestellt. In den Spuren 2 und 3 ist die Laufverzögerung im PAA-Gel aufgrund der TetR-Bindung deutlich zu sehen. In Spur 4 tritt nochmals ein *Shift* auf, der wohl mit der Besetzung der zweiten *tetO*-Sequenz zu erklären ist. Damit wurde gezeigt, dass sich beide *tetO* auf der  $\lambda$ -*tetO*-DNA etwa mittig im Bereich zwischen 23,1 kbp und 24,8 kbp befinden, und der Nachweis für die Bindung von TetR an dieser DNA erbracht.



**Abb. 4.16:** PAA-Gel zum Nachweis der TetR-*tetO*-Bindung am 1700 bp-Fragment von  $\lambda$ -*tetO*-DNA mittels *Shift* (Spuren 1-3). Der nochmalige *Shift* in Spur 4 zeigt wohl die Besetzung der zweiten *tetO*-Bindestelle auf diesem Fragment an. Die angegebene Proteinkonzentration bezieht sich auf die Anzahl an Monomeren. Gelstärke: 5% PAA, Spannung: 80 V, DNA-Färbung mit SYBR Green I.

## 4.5 Herstellung von DNA-Verknüpfungen mit dem modifizierten TetR-Protein

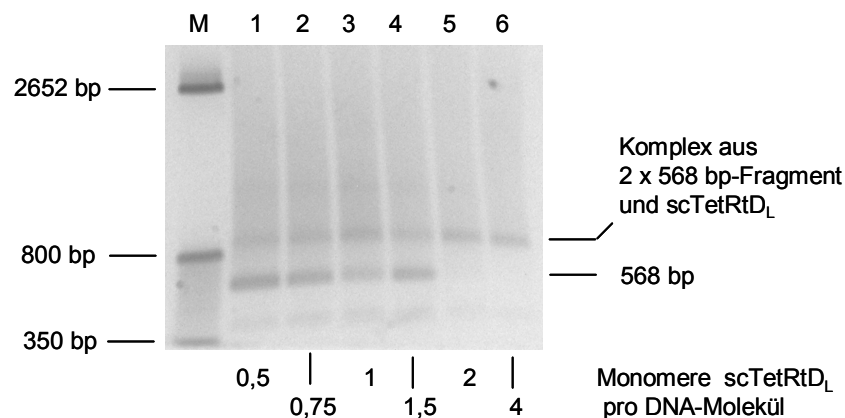
Das Protein scTetRtD<sub>L</sub> ist durch die LexA-Dimerisierungsdomäne und die damit verbundene Fähigkeit zur Verknüpfung jeweils zweier Monomere so modifiziert, dass das Protein gleichzeitig an zwei *tetO*-Sequenzen binden und so zwei DNA-Moleküle miteinander verbinden kann (siehe Abbildung 4.3). Dadurch ist es möglich, verschiedene DNA-Strukturen, wie z. B. Kreuzungen oder aneinander gekettete Moleküle, zu konstruieren. Solche Verbindungen sind außerdem schaltbar, sie können durch Zugabe von Tetracyclin wieder gelöst werden.



### 4.5.1 Strukturen aus kurzen DNA-Fragmenten

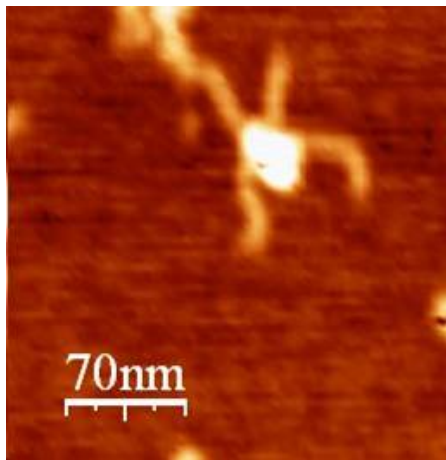
Für die ersten Untersuchungen zur Darstellung von Verbindungen von zwei DNA-Strängen mit scTetRtD<sub>L</sub> wurden 568 bp-Fragmente verwendet, die etwas außermittig bei 216 bp die *tetO*-Sequenz besitzen. Der Nachweis der Komplexbildung erfolgte durch die Ausbildung eines *Shiftes* bei der Gelelektrophorese, in diesem Fall im Agarosegel. Strukturen, die scTetRtD<sub>L</sub> enthalten, liefen auch in ein schwach konzentriertes, 5-prozentiges PAA-Gel nicht ein. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden DNA und Protein 40 min in einer Pufferlösung bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zusammensetzung der Pufferlösung richtete sich nach der Variante des eingesetzten Proteins. scTetRtD<sub>L</sub>-Proteine der Variante B enthalten mehrere Cysteine innerhalb des Moleküls, sodass unerwünschte Schwefelbrückenbindungen möglich sind. Zur Spaltung solcher Disulfidbrücken und um die freien SH-Gruppen im reduzierten Zustand zu halten, war ein DTT (Dithiothreitol)-haltiger Puffer (NEB 4, 1mM DTT) nötig. scTetRtD<sub>L</sub>-Proteine der Variante BD sind cysteinfrei, hier konnte mit 50-100 mM Phosphatpuffer (pH 7,5) gearbeitet werden.

In Abbildung 4.17 ist in den Spuren 1-6 die Menge der gebildeten Komplexe aus zwei 568 bp-Fragmenten in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration dargestellt. Mit steigender Anzahl an Monomeren scTetRtD<sub>L</sub> pro DNA-Molekül nimmt der Anteil an Verknüpfungen zu, bis bei einem Moleküلزahlverhältnis DNA:Protein von 1:4 alle DNA-Fragmente komplexiert sind.



**Abb. 4.17:** Agarosegel zum Nachweis von Verknüpfungen aus 568 bp-Fragmenten und scTetRtD<sub>L</sub> mittels *Shift*. Mit steigender Proteinkonzentration nimmt die Menge an einzelnen DNA-Molekülen ab und der Anteil an Verknüpfungen aus zwei DNA-Molekülen zu, bis bei einem Molekülverhältnis 568 bp-Fragment: scTetRtD<sub>L</sub> von 1:4 alle DNA-Fragmente komplexiert sind. Gelstärke: 1 % Agarose, Spannung: 100 V, DNA-Färbung mit SYBR Green I.

Aufgrund der Position der *tetO*-Sequenz auf dem 568 bp-Fragment entstanden kleine kreuzförmige DNA-Strukturen, die mit dem Rasterkraftmikroskop abgebildet werden konnten (Abbildung 4.18). In der Mitte dieses Kreuzes befindet sich das scTetRtD<sub>L</sub>-Protein. Eine Vernetzung von DNA und Proteinen mit Glutaraldehyd und eine nachfolgende Abtrennung des Proteinüberschusses waren nicht nötig, da bei diesen Proben nur ein geringer Proteinüberschuss anfiel. Das eingesetzte Molekülverhältnis DNA:Protein von 1:4 bedeutete den Verbrauch von zwei DNA-Molekülen und zwei Proteinmonomeren für die Bildung eines Komplexes und einen Proteinüberschuss von nur drei Dimeren.

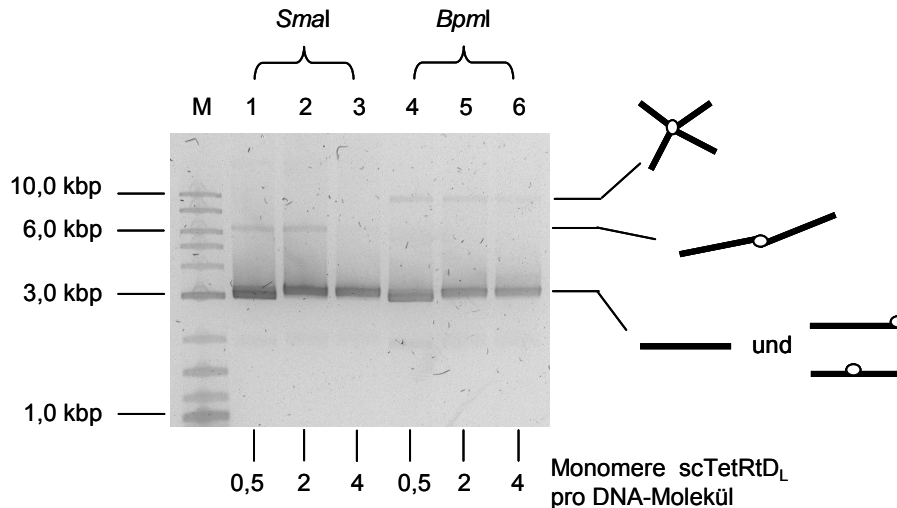


**Abb. 4.18:** AFM-Aufnahme einer kreuzförmigen DNA-Struktur aus zwei 568 bp-Fragmenten, die mittels scTetRtD<sub>L</sub> miteinander verknüpft sind.

#### 4.5.2 Verknüpfungen von Plasmiden

Größere DNA-Strukturen konnten durch Verknüpfung der ca. 1 µm langen linearisierten Plasmide pUC19/AV16 hergestellt werden. Durch das Aufschneiden des Plasmides mit verschiedenen Restriktionsenzymen und der daraus resultierenden Variation der Position von *tetO* bestand die Möglichkeit der gezielten Konstruktion von bestimmten Strukturen (siehe Abbildung 4.9). So wurden Plasmide mit dem Enzym *Sma*I verdaut, was zur Positionierung von *tetO* in der Nähe des Molekülenendes führte. Nach Verbindung dieser Moleküle mit scTetRtD<sub>L</sub> entstanden aneinander gekettete Moleküle. Wurde mit *Bpm*I geschnitten, lag die *tetO*-Sequenz im Ring gegenüber der Schnittstelle und es konnten infolge Proteinbindung Kreuzungen hergestellt werden. Der Nachweis der Verknüpfungen erfolgte wie bei den 568 bp-Fragmenten durch *Shift*experimente im Agarosegel. Zuvor wurden die Reaktionspartner in Pufferlösung (NEB 4) bei Raumtemperatur inkubiert.

Im Gelbild in Abbildung 4.19 ist die Bildung von Verknüpfungen aus Plasmiden, die mit *Sma*I und *Bpm*I verdaut wurden, in Abhängigkeit von der eingesetzten Proteinmenge dargestellt.



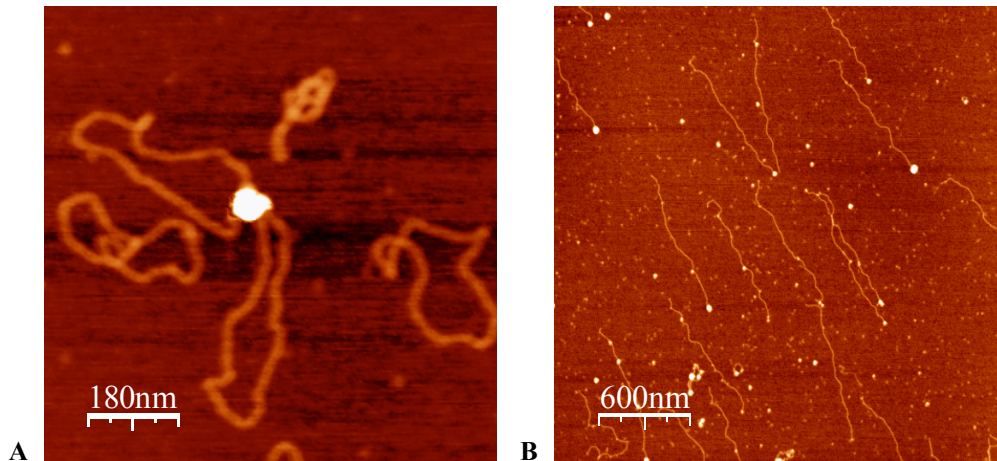
**Abb. 4.19:** Agarosegel zum Nachweis von Verknüpfungen aus mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnittenen Plasmiden pUC19/AV16 mittels *Shift*. Die infolge *Bpm*I-Schnitt entstandenen *Kreuzungen* laufen stärker verzögert als die *Verlängerungen* nach *Sma*I-Schnitt. Die höchste Konzentration an Verknüpfungen entstand jeweils bei einem Molekülverhältnis DNA:scTetRtD<sub>L</sub> von 1:0,5. Gelstärke: 1 % Agarose, Spannung: 80 V, DNA-Färbung mit SYBR Green I, M (Marker): 2-log-Leiter.

Es fällt auf, dass keine vollständige Komplexierung erreicht werden konnte. Der größte Teil der DNA-Moleküle liegt frei oder an Protein gebunden vor (jeweils stärkste Bande im Gel, Abb. 4.19). Die höchste Konzentration an Komplexen entstand bei beiden Schnittvarianten bei einem Molekülverhältnis von DNA : Protein von 1:0,5. Eine quantitative Auswertung dieser Spuren im Gelbild ergab, dass ca. 1/10 der Menge an freier DNA als Komplex gebunden war. Im Vergleich mit dem vorherigen Abschnitt zum Aufbau von Strukturen aus 568 bp-Fragmenten zeigte sich also, dass mit Zunahme der Länge der verwendeten DNA-Stränge die „Ausbeute“ an Komplexstrukturen abnahm. Das ist verständlich, da bei langen Molekülen die Wahrscheinlichkeit geringer ist, dass die Proteinbindestellen von zwei benachbarten DNA-Knäueln so zugänglich werden, dass sie mit einem Protein verbunden werden können. Wird nun viel Protein angeboten, dann kann an jeder DNA Protein binden, aber infolge dieser Besetzung aller *tetO* können die DNA-Moleküle nicht verknüpft werden. Dieser Sachverhalt ist auch im Gelbild in den Spuren 2 und 3 sowie 5 und 6 zu sehen. Hier bleiben die starken Banden leicht hinter denen in den Spuren 1 und 4 zurück, was die Anbindung von Protein an der DNA anzeigt. In den Spuren 1 und 4 sind die starken Banden Doppelbanden, die vorlaufende Bande ist die der freien DNA. Es existiert außerdem die Möglichkeit, dass DNA mit nur einem scTetRtD<sub>L</sub>-Monomer, also einem halben scTetRtD<sub>L</sub>-Protein, auftritt, denn die Bindekonstante für

LexA-Monomere ist mit  $2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$  [SCN] etwas kleiner als die Bindekonstante für TetR an *tetO*. Für eine Komplexbildung aus dem Plasmid mit 3028 bp Länge ist das Molekülverhältnis von DNA:Protein von 1:0,5 optimal.

Das abgebildete Gel zeigt außerdem deutlich, dass das Laufverhalten von DNA während der Elektrophorese stark von der Molekülform abhängt. Die nach dem *SmaI*-Schnitt entstandenen aneinander geketteten Moleküle laufen im Gel auf einer Höhe von etwa 6,0 kbp und damit entsprechend einem einzelnen 6,0 kbp langen Fragment. Die kreuzförmige Struktur nach *BpmI*-Schnitt besitzt dieselbe Masse, läuft aber strukturebedingt im Gel deutlich verzögert auf einer Höhe von ca. 10,0 kbp.

Die Abbildung der entstandenen Strukturen mit dem AFM wird mit zunehmender DNA-Länge schwieriger, weil bei der Probenpräparation eine äußere Kraft zum Strecken der Moleküle aufgewendet werden muss, die zu einer Veränderung der Strukturen führen kann. Anders verhielt es sich bei der Abbildung von Verknüpfungen aus zwei geschlossenen Plasmiden mit dem scTetRtD<sub>L</sub>, wie im Teilbild A der Abbildung 4.20 zu sehen ist. Hier reichte die Steifigkeit der Moleküle für eine definierte Adsorption der DNA aus dem stehenden Tropfen aus. Strukturen aus aufgetrennten Plasmiden dagegen adsorbierten in einer verknäuelten Konformation, sodass sie und die Positionen der Proteine nicht eingeschätzt werden konnten. Wie bereits im Abschnitt 4.4.2 beschrieben, wurde deshalb bei der Probenpräparation die DNA-Lösung über die Glimmeroberfläche gespült. Das Verfahren hatte zur Folge, dass wegen der starken Adsorption aufgrund der geladenen Glimmeroberfläche auf die Biomoleküle eine große Kraftwirkung ausgeübt wurde, die wohl zur Spaltung von DNA-Proteinbindungen führte. Im Teilbild B von Abbildung 4.20 ist eine Vielzahl von mit *SmaI* aufgetrennten Plasmiden, in eine Richtung gestreckt, dargestellt. An den Molekülen sind Proteine gebunden, aber eine eindeutige Verknüpfung konnte nicht ausgemacht werden. In der oberen Bildmitte befindet sich eine eventuell gelöste Verbindung. Es fällt außerdem auf, dass beim Strecken der Moleküle das Ende mit dem Protein zuerst adsorbierte und die restliche DNA danach gestreckt wurde. TetR-Proteine adsorbierten auf Glimmer immer sehr stark. Möglicherweise ist dieser Fakt auch eine Ursache für das Fehlen echter Verknüpfungen auf der AFM-Abbildung, denn es können DNA-Moleküle mit Protein bevorzugt adsorbiert worden sein, während die abgetrennten Moleküle ohne Protein bei der Prozedur weggespült wurden. Die Streckrichtung verläuft im Bild von rechts unten nach links oben.



**Abb. 4.20:** AFM-Aufnahmen von an Plasmide pUC19/AV16 gebundenem Protein scTetRtD<sub>L</sub>.

**A)** Plasmide sind durch scTetRtD<sub>L</sub> miteinander verbunden. Probenpräparation durch Adsorption der Moleküle auf Glimmer ist ohne äußere Krafteinwirkung möglich.

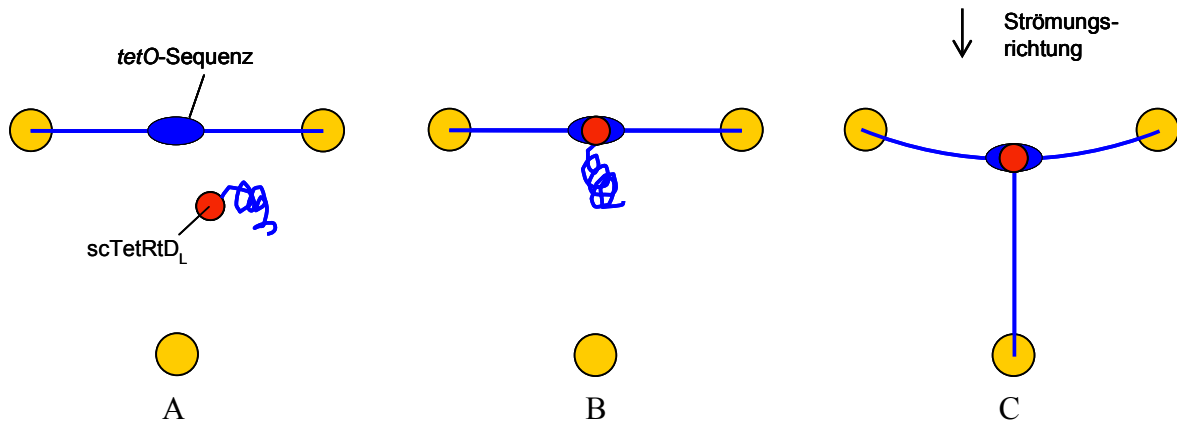
**B)** Überblick über eine Vielzahl von mit *Sma*I aufgetrennten Plasmiden mit gebundenem scTetRtD<sub>L</sub>. Bei der Probenpräparation ist eine Kraftwirkung zum Strecken der Moleküle notwendig, die zur Aufspaltung der DNA-Protein-Bindung führen kann, sodass der Nachweis der Verbindung zweier DNA durch AFM schwierig ist.

## 4.6 Diskussion und Ausblick hinsichtlich Netzwerkaufbau

In den vorangegangenen Abschnitten wurde dargestellt, wie durch die Nutzung des Tet-Systems DNA-Moleküle definiert miteinander verknüpft werden können. Es wurde die Bindung sowohl des einfachen TetR als auch des modifizierten Proteins scTetRtD<sub>L</sub> an die *tetO*-Sequenz eingehend untersucht und nachgewiesen. Anhand des ca. 1 µm langen Plasmides pUC19/AV16 wurde die Möglichkeit der Herstellung von Konstrukten unterschiedlicher Konformation aus zwei DNA-Molekülen gezeigt. Die entstandenen DNA-Protein-Komplexe konnten mit Hilfe des Rasterkraftmikroskops sichtbar gemacht werden. Eine spezielle λ-DNA mit *tetO* und einer Konturlänge von 15,3 µm wurde charakterisiert, indem die exakten Positionen von *tetO* bestimmt und die Bindung an TetR demonstriert wurde. Alle diese Ergebnisse sind Grundlage, um mit dem Tet-System DNA-Verknüpfungen auf Kontaktstrukturen aufbauen zu können.

Ein Vorschlag für eine mögliche Struktur ist in Abbildung 4.21 dargestellt. Der erste Schritt sollte darin bestehen, eine λ-*tetO*-DNA mit ihren Enden an zwei Goldkontakten anzubinden und zwischen den Kontakten zu spannen. Die beiden *tetO* befinden sich etwa mittig mit einem Abstand von 43 bp auf diesem Molekül. Es werden außerdem DNA-Moleküle benötigt, die *tetO*-Sequenzen an einem Molekülende tragen, damit dort das Protein scTetRtD<sub>L</sub> gebunden werden kann (Teilbild A). Im Teilbild B ist dargestellt, wie durch die sequenzspezifische Bindung des scTetRtD<sub>L</sub> an einer zweiten *tetO*-Sequenz der

gespannten DNA beide DNA-Moleküle miteinander verknüpft werden können. Ist diese schaltbare Verbindung hergestellt, kann auch das zweite DNA-Molekül so gestreckt werden, dass es mit dem anderen Moleküle am Goldkontakt gebunden werden kann (Teilbild C).



**Abb. 4.21:** Vorschlag für den Aufbau eines schaltbaren DNA-Netzes an Goldkontakten.

A)  $\lambda$ -*tetO*-DNA wird zwischen zwei Goldkontakten gespannt. An ein zweites DNA-Molekül mit *tetO* am Molekülende wird das Protein *scTetRtD<sub>L</sub>* gebunden.

B) Die schaltbare Verknüpfung beider DNA wird über *scTetRtD<sub>L</sub>* realisiert.

C) Die zweite DNA wird im Flüssigkeitsstrom gestreckt und am Gold kontaktiert.

Die zum Strecken der DNA notwendige Kraft kann durch eine strömende Flüssigkeit aufgebracht werden. In der Literatur ist bereits gezeigt worden, dass es möglich ist, einzelne  $\lambda$ -DNA-Moleküle in einer Flusszelle zwischen zwei Goldelektroden zu spannen und anzubinden [MER]. Die Bindung erfolgte aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen zwischen den negativ geladenen Enden der DNA-Moleküle und den mit positiv geladenen Aminogruppen funktionalisierten Goldkontakten. Dass eine Verankerung von DNA auf Goldoberflächen grundsätzlich auch mit anderen Methoden möglich ist, wurde in Abschnitt 1 dargelegt. Das Spannen des ersten DNA-Moleküls, der  $\lambda$ -*tetO*-DNA in Teilbild A, sollte folglich Erfolg haben.

Die Bildung von Verknüpfungen zweier DNA-Moleküle durch das modifizierte TetR-Protein *scTetRtD<sub>L</sub>* war Gegenstand zahlreicher Experimente in dieser Arbeit, das Verhalten der Bindung zwischen *tetO* und TetR im dynamischen Experiment in einer Flusszelle ist dagegen noch nicht untersucht worden und stellt eine anspruchsvolle Thematik dar.

Das DNA-Molekül mit der *tetO*-Sequenz darf im hydrodynamischen Fluss nicht überstreckt werden, da eine exakte Passung der beiden Bindungspartner DNA und Protein nur dann möglich ist. Die Erkennungshelices beider Monomere des TetR haben einen Abstand von 3,4 nm zueinander und passen so in zwei aufeinander folgende große Furchen der DNA. Es ist bekannt, dass eine Abstandsänderung von nur 3 Å ein Lösen der Bindung verursacht [SCH 1]. Der gleiche Grundgedanke führt zur Problematik der



Fluoreszenzmarkierung mit YOYO-1. Experimente in einer Flusszelle werden aufgrund ihrer Dynamik fluoreszenzmikroskopisch beobachtet, dazu müssen DNA und eventuell auch Proteine mit Fluoreszenzmarkern versehen werden. Hohe Markierungsraten führen zu starken Strukturänderungen im DNA-Molekül, so z. B. zur Vergrößerung der Konturlänge aufgrund der Interkalation des Markers [SIS]. Damit ist die molekulare Erkennung und Bindung von *tetO* und TetR nicht mehr gewährleistet. Bei eigenen Bindeexperimenten wurde schon bei geringen Markierungsraten von 0,05 wegen der Konformationsänderung der DNA die Proteinbindung teilweise unterdrückt. Es wird deshalb empfohlen, die Markierungsrate für YOYO-1 auf noch geringere Werte als 0,05 zu senken, damit innerhalb der *tetO*-Sequenz möglichst keine Markermoleküle interkalieren. Die Markierung sollte nur so stark sein, dass die DNA-Moleküle gerade noch zu erkennen und zu bewerten sind.

Die Wahl des Puffers ist ebenfalls wichtig für dieses Experiment, denn es werden verschiedene Anforderungen an ihn gestellt. Zum einen muss er die Bindung zwischen *tetO* und TetR bzw. scTetRtD<sub>L</sub> unterstützen, dafür sind nach eigenen Experimenten die Substanzen HEPES, Tris, NEB 4 und Phosphatpuffer in einem pH-Bereich von 7-8 geeignet. Andererseits muss in diesem Milieu die Anbindung der DNA auf den Goldkontaktflächen möglich sein. Hierzu wird in der Literatur die Bindung durch elektrostatische Wechselwirkungen in Tris/EDTA-Puffer beschrieben [OPI 2]. In eigenen Versuchen konnte dies bestätigt und außerdem die Bindung von mit Thiolgruppen funktionalisierter  $\lambda$ -DNA an Gold in Phosphatpuffer gezeigt werden. Soll die DNA-Verankerung über eine Schwefel-Gold-Bindung erfolgen, dann ist dafür ein DTT-haltiger Puffer, wie z. B. NEB 4, nicht geeignet, weil DTT aufgrund der Thiolgruppen ebenfalls auf der Goldoberfläche binden wird und so die DNA-Anbindung behindern kann. Der Zusatz von DTT ist aber bei der Verwendung des scTetRtD<sub>L</sub> der cysteinhaltigen Variante B nötig, um unerwünschte Schwefelbrückenbindungen innerhalb des Proteins zu unterdrücken.

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Konzentrationsabhängigkeit der Bindungsreaktion zwischen *tetO* und TetR. Wie in den beschriebenen *Shift*-Experimenten ermittelt, ist ein bestimmter Proteinüberschuss notwendig, um eine hohe Bindungsrate zu erreichen. Deshalb sollte im gesamten Pufferkreislauf des Versuchsaufbaus die Proteinkonzentration konstant sein. Eine Ableitung des Proteinüberschusses ist erst dann möglich, wenn *tetO* und TetR dauerhaft miteinander vernetzt sind. In diesem Fall ist aber die Schaltbarkeit der Bindung fraglich. Eine Vernetzung der Aminogruppen von DNA und Protein ist z. B. mittels Glutaraldehydlösung erreichbar [KER]. Eine andere Variante für das Crosslinking stellt die Bestrahlung mit UV-Licht dar, hier kommt es ebenfalls zur kovalenten Verknüpfung von DNA und Protein.



## Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit Grundlagenuntersuchungen zum Aufbau von nanoskopischen Netzwerken aus DNA. Dabei werden zwei Wege verfolgt: Das Stempeln von DNA-Molekülen auf ein Substrat und die Herstellung von Verknüpfungen aus DNA mit Hilfe von Bindeproteinen.

### Stempeln von DNA-Molekülen

In dieser Arbeit wurde ein Beitrag zu den materialwissenschaftlichen Grundlagen des Übertragens von DNA mit der Stempel-Technik erbracht. Hierbei wurden sowohl das Beladen des Stempels durch *Molecular Combing* als auch die Übertragung der Moleküle durch *Transfer Printing* unter den speziellen Bedingungen der Verwendung von DNA-Molekülen vertieft untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, gestreckte DNA-Moleküle zielgerichtet in eine mikroelektronische Struktur mit Goldkontakten zu übertragen. Dazu wurde ein Verfahren erarbeitet, bei dem die Kontaktstruktur und ein dazu passender, strukturierter PDMS (Polydimethylsiloxan)-Stempel exakt positioniert werden können.

Das Adsorptionsverhalten von DNA auf PDMS wurde in Abhängigkeit vom pH-Wert des Puffers untersucht. Im gesamten pH-Bereich von 4 bis 10 wurde Adsorption mit hoher Belegungsdichte und vollständiger Streckung der Moleküle beobachtet. Diese Beobachtung kann im Rahmen eines phänomenologischen Modells erklärt werden, das auf einer Bilanz der Adsorptionskraft und der für die Streckung der DNA notwendigen Kraft beruht. In der Literatur wird hingegen berichtet, dass bisher nur in einem kleinen pH-Bereich um 5,5 diese hohe Adsorptionsrate gestreckter Moleküle auf einer hydrophoben Oberfläche erreicht werden konnte.

Das Adsorptionsverhalten von DNA auf PDMS wurde in Abhängigkeit von der NaCl-Molarität des Puffers untersucht. Es wurde festgestellt, dass mit steigender Salzkonzentration die Belegungsdichte an Molekülen zunimmt und bei ca. 100 mM ein Maximum aufweist. Aus dem Gang der Anzahl der adsorbierten Moleküle mit der Salzkonzentration ist erkennbar, dass dieser Prozess zumindest durch zwei konkurrierende Mechanismen bestimmt ist: der Zunahme der Bindungen zwischen DNA und Substrat aufgrund steigender Adsorption von  $\text{Na}^+$ -Ionen auf der DNA bzw. dem Substrat und von

Cl<sup>-</sup>- Ionen auf dem Substrat (dies führt zu einer Zunahme der Adsorptionsrate) und der Stabilisierung des Doppelstranges (dies führt zu einer Abnahme der Adsorptionsrate).

Die hohe Adsorptionsrate geschlossener Plasmide zeigte, dass die Adsorption auf PDMS auch bei DNA-Molekülen möglich ist, die keinen bevorzugten Ort für das Aufschmelzen des Doppelstranges haben. Experimentell konnten die Ergebnisse einer Modellrechnung bestätigt werden, wonach bei doppelsträngiger DNA bereits zwei aufgeschmolzene Basenpaare ausreichen, damit die Adsorption über hydrophobe Wechselwirkungen beginnen kann.

Der Nachweis der vollständigen Übertragung der DNA-Moleküle während des Transfers vom Stempel auf das Substrat wurde rasterkraftmikroskopisch geführt.

Der Transferprozess wurde experimentell untersucht und daraus resultierend seine Darstellung als zweistufiger Mechanismus vorgeschlagen. Es wurde gezeigt, dass Wassermolekülen beim Übertragungsprozess die entscheidende Rolle zukommt: Wassermoleküle, die sich entlang der DNA befinden, müssen den Kontakt zum Wasserlayer auf dem Glas vermitteln, so dass die DNA nach dem Prinzip des kapillaren Greifens übertragen werden kann.

### **DNA-Verknüpfungen mittels Tet-Repressor-Protein**

Die aus der bakteriellen Genregulation bekannte sequenzspezifische Bindung zwischen der *tetO*-Sequenz auf der DNA und dem TetR-Protein wurde genutzt, um definierte Konstrukte aus DNA und Bindeproteinen herzustellen. Mit dem modifizierten Protein scTetRtD<sub>L</sub>, das zwei Bindedomänen für *tetO* besitzt, konnten jeweils zwei DNA-Moleküle verknüpft werden.

Aus 568 bp-Fragmenten, die leicht außermittig die *tetO*-Sequenz tragen, wurden durch die Bindung mit scTetRtD<sub>L</sub> kreuzförmige DNA-Strukturen hergestellt.

Das ca. 1 µm lange, linearisierte und *tetO*-tragende Plasmid pUC19/AV16 wurde verwendet, um größere Strukturen herzustellen. Durch Schneiden des Plasmides mit verschiedenen Restriktionsenzymen und der daraus resultierenden Variation der Position von *tetO* ist die Konstruktion von unterschiedlichen Strukturen möglich. Mittels Proteinbindung wurden Kreuzungen und aneinander gekettete Moleküle (so genannte Verlängerungen) erzeugt.

Die konstruierten DNA-Protein-Komplexe wurden mit dem Rasterkraftmikroskop abgebildet.

Der Nachweis der *tetO*-TetR-Bindung wurde in allen Fällen elektrophoretisch durch *Shift*-Experimente geführt.

Mittels Gelelektrophorese wurde der Einfluss der sequenzinduzierten Biegungen im Plasmid pUC19/AV16 auf das Laufverhalten im Gel untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Mobilitäten der linearisierten Plasmide im Gel von der Lage der Biegungen im

Molekül abhängen. Die Laufverzögerung nahm zu, je weiter die Biegungen in Richtung Molekülmitte rückten.

Eine modifizierte  $\lambda$ -DNA mit zwei *tetO*-Sequenzen, die sich aufgrund ihrer Länge von ca. 15  $\mu\text{m}$  für den zukünftigen Aufbau von DNA-Netzwerken auf Kontaktstrukturen anbietet, wurde elektrophoretisch analysiert. Die bisher unbekannten Positionen der *tetO*-Sequenzen konnten bestimmt und der Nachweis der TetR-Bindung an beiden *tetO* gezeigt werden.

Es wurde demonstriert, dass es mit beiden Techniken möglich ist, einfache Strukturen aus DNA herzustellen. DNA, das Speichermedium des genetischen Codes der Lebewesen, wird somit in einen technischen Kontext gesetzt.

Konstrukte aus DNA, wie Kreuzungen und Netzwerke, könnten in Zukunft in der Mikro- und Nanoelektronik als Template oder auch als eigentliche Funktionselemente Anwendung finden, da die fortschreitende Miniaturisierung der elektronischen Bauelemente eine deutliche Verkleinerung der Strukturen fordert. Wegen ihrer geringen Abmessungen sind DNA-Moleküle für den Aufbau solcher Nanostrukturen besonders geeignet.

Aber auch aufgrund weiterer Eigenschaften ist DNA für die Konstruktion von Netzwerken interessant. Dazu gehört die mechanische Festigkeit bei gleichzeitiger Flexibilität, die durch das Zusammenwirken der verschiedenen intramolekularen Bindungsarten bestimmt wird, genauso wie die Fähigkeit zur Interaktion mit Proteinen und der amphiphile Charakter des Moleküls, der bei der Adsorption auf verschiedenen Oberflächen vorteilhaft für die Prozessgestaltung genutzt werden kann.

---

## Literatur

- [ACK] Th. Ackermann: Physikalische Biochemie. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1992.
- [ADL] L. Adleman, Science 266, 1021-1024 (1994).
- [ALL] J.-F. Allemand, D. Bensimon, L. Jullien, A. Bensimon, V. Croquette, Biophysical Journal 73, 2064-2070 (1997).
- [AME] S. L. Ameres, L. Druempel, K. Pfeleiderer, A. Schmidt, W. Hillen, C. Berens, EMBO Journal 24, 358-367 (2005).
- [BAL] F. J. Baldino, M. F. Chesselet, M. E. Lewis, Methods Enzymol 168, 761-777 (1989).
- [BAU] C. G. Baumann, S. B. Smith, V. A. Bloomfield, C. Bustamante, PNAS 94, 6185-6190 (1997).
- [BLA] G. M. Blackburn and M. J. Gait: Nucleic acids in chemistry and biology. Oxford University Press, 1996.
- [BEN 1] A. Bensimon, A. Simon, A. Chiffaudel, V. Croquette, F. Heslot, D. Bensimon, Science 265, 2096-2098 (1994).
- [BEN 2] D. Bensimon, A. J. Simon, V. Croquette, A. Bensimon, Physical Review Letters 74, No. 23, 4754-4757 (1995).
- [BEK] A. Benke, K. Rasim, M. Mertig: Transfer Printing of DNA Molecules – Analysis of Transfer Mechanism, Artikel in Vorbereitung.
- [BER] A. Bernard, J. P. Renault, B. Michel, H. R. Bosshard, E. Delamarche, Advanced Materials 12, No. 14, 1067-1070 (2000).
- [BEZ] M. Bezanilla, S. Manne, D. E. Laney, Y. L. Lyubchenko, H. G. Hansma, Langmuir 11, 655-659 (1995).
- [BIB] M. Biburger, Dissertation, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, 1997.
- [BRA] E. Braun, Y. Eichen, U. Sivan, G. Ben-Yoseph, Nature 391, 775-778 (1998).
- [BUS 1] C. Bustamante, Z. Bryant, S. B. Smith, Nature 421, 423-426 (2003).
- [BUS 2] C. Bustamante, J. F. Marko, E. D. Siggia, S. B. Smith, Science 265, 1599-1600 (1994).
- [CEN] Y. Chen, M. Wang, C. Mao, Angewandte Chemie 43, 3554-3557 (2004).

- 
- [CHE] J. Chen, N. C. Seeman, *Nature* 350, 631-633 (1991).
- [DEN] Z. Deng, C. Mao, *Nanoletters* 3, No. 11, 1545-1548 (2003).
- [DIT 1] W. U. Dittmer, F. C. Simmel, *Nanoletters* 4, No. 4, 689-691 (2004).
- [DIT 2] W. U. Dittmer, F. C. Simmel, *Applied Physics Letters* 85, 633-635 (2004).
- [DOW] Auskunft der Firma *Dow Corning GmbH* Wiesbaden (Herr M. Kavcic, 2007).
- [DRU] T. G. Drummond, M. G. Hill, J. K. Barton, *Nature Biotechnology* 21, No. 10, 1192-1199 (2003).
- [FAN] C. Fan, K. W. Plaxco, A. J. Heeger, *PNAS* 100, No. 16, 9134-9137 (2003).
- [FÖR] BMBF-Förderprogramm IT-Forschung, Förderkonzept Nanoelektronik, 2006.
- [GAD] M. Gad, S. Sugiyama, T. Ohtani, *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics* 21, 387-393 (2003).
- [GIE] B. Giese, J. Amaudrut, A.-K. Köhler, M. Spormann, S. Wessely, *Nature* 412, 318-320 (2001).
- [GLA] A. N. Glazer, H. S. Rye, *Nature* 359, 859-861 (1992).
- [GOO] R. P. Goodman, R. M. Berry, A. J. Turberfield, *Chemical Communications* 12, 1372-1373 (2004).
- [GUA] J. Guan, L. J. Lee, *PNAS* 102, No. 51, 18321-18325 (2005).
- [GUE] Z. Gueroui, C. Place, E. Freyssingeas, B. Berge, *PNAS* 99, No. 9, 6005-6010 (2002).
- [HAN] H. G. Hansma, D.E. Laney, *Biophysical Journal* 70, 1933-1939 (1996).
- [HEU] C. Heuer, W. Hillen, *Journal of Molecular Biology* 202, 407-415 (1988).
- [HIN] W. Hinrichs, C. Kisker, M. Düvel, A. Müller, K. Tovar, W. Hillen, W. Saenger, *Science* 264, 418-420 (1994).
- [HOG] M. E. Hogan, R. H. Austin, *Nature* 329, 263 (1987).
- [HÖG] A. Höglund, O. Kohlbacher, *Proteome Science* 2 (2004).
- [HU] J. Hu, Y. Zhang, H. Gao, M. Li, U. Hartmann, *Nanoletters* 2, No. 1, 55-57 (2002).

- 
- [JIN] J. Jing, J. Reed, J. Huang, V. Clarke, J. Edington, D. Housman, T.S. Anantharaman, E. J. Huff, B. Mishra, B. Porter, A. Shenker, E. Wolfson, C. Hiort, R. Kantor, C. Aston, D. C. Schwartz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 8046-8051 (1998).
- [KAF] Y. Kafri, D. Mukamel, L. Peliti, *Eur. Phys. J. B*, 135-146 (2002).
- [KAM] A. Kamionka, J. Bogdanska-Urbaniak, O. Scholz, W. Hillen, *Nucleic Acids Research* 32, No. 2, 842-847 (2004).
- [KEP] B. K. Keppler, A. Ding: *Chemie für Biologen*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford, 1997.
- [KER] K. Keren, M. Krueger, R. Gilad, G. Ben-Yoseph, U. Sivan, E. Braun, *Science* 297, 72-75 (2002).
- [KLE] D. C. G. Klein, L. Gurevich, J. W. Janssen, L. P. Kouwenhoven, J. D. Carbeck, L. L. Sohn, *Applied Physics Letters* 78, No. 16, 2396-2398 (2001).
- [KLEI] C. Kleinschmidt, K. Tovar, W. Hillen, D. Porschke, *Biochemistry* 27, 1094-1104 (1988).
- [KNI 1] R. Knippers: *Molekulare Genetik*. Georg Thieme Verlag, 8. Auflage, 2001.
- [KNI 2] R. Knippers: *Molekulare Genetik*. Georg Thieme Verlag, 7. Auflage, 1997.
- [KOO] H.-S. Koo, D. M. Crothers, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 1763-1767 (1988).
- [KRA] O. Kratky, G. Porod, *Rec. Trav. Chim.* 68, 1106-1113 (1949).
- [KRU] C. Krueger, C. Berens, A. Schmidt, D. Schnappinger, W. Hillen, *Nucleic Acids Research* 31, No. 12, 3050-3056 (2003).
- [LED 1] Th. Lederer, Dissertation, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, 1996.
- [LED 2] Th. Lederer, M. Kintrup, M. Takahashi, P. E. Sum, G. A. Ellestad, W. Hillen, *Biochemistry* 35, No. 23, 7439-7446 (1996).
- [LEG] J. F. Leger, G. Romano, A. Sarkar, J. Robert, L. Bourdieu, D. Chatenay, J. F. Marko, *Physical Review Letters* 83, 1066-1069 (1999).
- [LEW] J. P. Lewis, P. Ordejón, O. F. Sankey, *Phys. Review B* 55, 6880-6887 (1997).
- [LIU 1] Y.-Y. Liu, P.-Y. Wang, S.-X. Dou, W.-C. Wang, P. Xie, H.-W. Yin, X.-D. Zhang, *Journal of chemical physics*, 121, No. 9, 4302-4309 (2004).
- [LIU 2] Y.-Y. Liu, P.-Y. Wang, S.-X. Dou, P. Xie, W.-C. Wang, H.-W. Yin, *Chinese Science Bulletin* 50, No. 8, 731-737 (2005).

- 
- [LOT] F. Lottspeich, H. Zorbas: Bioanalytik. Spektrum Akademischer Verlag, 1998.
- [MAH] N. Mahajan, R. Lu, S. T. Wu, J. Fang, Langmuir 21, 3132-3135 (2005).
- [MAJ] M. Majewski, O. Scholz, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [MAR] J. F. Marko, S. Cocco, Physics World (2003).
- [MAS] M. Mascini, I. Palchetti, G. Marrazza, Fresenius Journal Analytical Chemistry 369, 15-22 (2001).
- [MAT] S. Matsuura, J. Komatsu, K. Hirano, H. Yasuda, K. Takashima, S. Katsura A. Mizuno, Nucleic Acids Research 29, Nr. 16, 79-83 (2001).
- [MEI] M. A. Meitl, Y. Zhou, A. Gaur, S. Jeon, M. L. Usrey, M. S. Strano, J. A. Rogers, Nanoletters 4, No. 9, 1643-1647 (2004).
- [MER] M. Mertig, L. Colombi Ciacchi, A. Benke, A. Huhle, J. Opitz, R. Seidel, H. K. Schackert, W. Pompe: DNA-based fabrication of metallic wires and networks, in: Foundations of Nanoscience: Self-assembled architectures and devices, Ed.: J. Reif, Science Technica, Inc., 132-145 (2004).
- [MOL] Molecular Probes, Katalog und Handbuch (2004).
- [MON] C. F. Monson, A. T. Wooley, Nanoletters 3, 359-363 (2003).
- [MÜL] C. Mülhardt: Der Experimentator: Molekularbiologie /Genomics, Spektrum Akademischer Verlag, 2003.
- [MUE] D. J. Müller, M. Amreim, A. Engel, Journal of Structural Biology 119, 172-188 (1997).
- [NAK 1] H. Nakao, H. Hayashi, T. Yoshino, S. Sugiyama, K. Otobe, T. Ohtani, Nanoletters 2, No. 5, 475-479 (2002).
- [NAK 2] H. Nakao, M. Gad, S. Sugiyama, K. Otobe, T. Ohtani, JACS 125, 7162-7163 (2003).
- [NIE] M. Niederweis, Th. Lederer, W. Hillen, Journal of Molecular Biology 228, 322-326 (1992).
- [NOO] D. van Noort, L. F. Landweber, National Computing 4, 163-175 (2005).
- [OPI 1] J. Opitz, B. Nietzsche, M. Mertig, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [OPI 2] J. Opitz, F. Braun, R. Seidel, W. Pompe, B. Voit, M. Mertig, Nanotechnology 15, 717-723 (2004).
- [ORT] P. Orth, D. Schnappinger, W. Hillen, W. Saenger, W. Hinrichs, Nature Structural Biology 7, No. 3, 215-219 (2000).



- 
- [OTO] K. Otobe, T. Ohtani, *Nucleic Acids Research* 29, No. 22, Pp. e109 (2001).
- [OUY] Z. Ouyang, J. Hu, S. Chen, J. Sun, M. Li, *J. Vac. Sci. Technol. B* 15(4), 1385-1387 (1997).
- [PET] J. T. Petty, J. Zheng, N. V. Hud, R. M. Dickson, *Journal Am. Chem. Soc.* 126, 5207-5212 (2004).
- [PEZ] A. Petzold: *Physikalische Chemie der Silikate und nichttoxischen Siliciumverbindungen*, VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie Leipzig, 1991.
- [RAU] K. Rauscher, J. Voigt, I. Wilke, K.-Th. Wilke: *Chemische Tabellen und Rechentafeln für die analytische Praxis*, VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie Leipzig, 1986.
- [RIC 1] J. Richter, M. Mertig, W. Pompe, I. Mönch, H. K. Schackert, *Applied Physics Letters* 78, 536-538 (2001).
- [RIC 2] J. Richter, persönliche Mitteilung.
- [RIE] M. Rief, J.M. Fernandez, H. E. Gaub, *Physical Review Letters* 81, 4764-4767 (1998).
- [RIV] C. Rivetti, M. Guthold, C. Bustamante, *Journal of Molecular Biology* 264, 919-932 (1996).
- [ROS] E. D. Ross, R. B. Den, P. R. Hardwidge, L. J. Maher, *Nucleic Acids Research* 27, No. 21, 4135-4142 (1999).
- [ROU 1] I. Rouzina, V. A. Bloomfield, *Biophysical Journal* 80, 882-893 (2001).
- [ROU 2] I. Rouzina, V. A. Bloomfield, *Biophysical Journal* 80, 894-900 (2001).
- [RYE] H. S. Rye, S. Yue, D. E. Wemmer, M. A. Quesada, R. P. Haugland, R. A. Mathies, A. N. Glazer, *Nucleic Acids Research* 20, No. 11, 2803-2812 (1992).
- [SAE] W. Saenger, P. Orth, C. Kisker, W. Hillen, W. Hinrichs, *Angewandte Chemie* 112, 2122-2133 (2000).
- [SAL] A. Salleo, W. S. Wong, M. L. Chabinyc, K. E. Paul, R. A. Street, *Advanced Functional Materials* 15, 1105-1110 (2005).
- [SAM] B. Samori, *Angew. Chem.* 110, 2318-2321 (1998).
- [SCÄ] B. Schäfer, Dissertation, Friedrich-Schiller-Universität Jena, 2001.
- [SCH 1] O. Scholz, Dissertation, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, 2002.

- 
- [SCH 2] O. Scholz, P. Schubert, M. Kintrup, W. Hillen, *Biochemistry* 39, 10914-10920 (2000).
- [SCH 3] O. Scholz, persönliche Mitteilung
- [SCI] A. Scipioni, C. Anselmi, G. Zuccheri, B. Samori, P. de Santis, *Biophysical Journal* 83, 2408-2418 (2002).
- [SCN] M. Schnarr, M. Granger-Schnarr, S. Hurstel, J. Pouyet, *FEBS Letters* 234, No. 1, 56-60 (1988).
- [SEE] N. C. Seeman, *Nature* 421, 427-431 (2003).
- [SEI] R. Seidel, Dissertation, TU Dresden, 2003.
- [SIS] A. Sischka, K. Toensing, R. Eckel, S. D. Wilking, N. Sewald, R. Ros, D. Anselmetti, *Biophysical Journal* 88, 404-411 (2005).
- [SIZ] C. Sizemore, A. Wissmann, U. Gülland, W. Hillen, *Nucleic Acids Research* 18, 2875-2880 (1990).
- [SMI] S. B. Smith, Y. Cui, C. Bustamante, *Science* 271, 795-798 (1996).
- [STE] E. Stellwagen, Y. Lu, N. C. Stellwagen, *Nucleic Acids Research* 33, No. 14, 4425-4432 (2005).
- [THI] C. Thibault, V. Le Berre, S. Casimirius, E. Trevisiol, J. Francois, C. Vieu, *Journal of Nanobiotechnology* 3 (2005).
- [TRI] E. N. Trifonov, *Nucleic Acids Research* 8, No. 17, 4041-4053 (1980).
- [TUR] A. J. Turberfield, J. C. Mitchell, B. Yurke, A. P. Mills, M. I. Blakey, F. C. Simmel, *Physical Review Letters* 90, No. 11, 118102 (2003).
- [UET] P. Uetz, E. Pohl: Protein-Protein- und Protein-DNA-Interaktionen in: Wink et al., *Molekulare Biotechnologie*, Wiley-VCH 2004.
- [VIA] V. Viasnoff, A. Meller, H. Isambert, *Nanoletters* 6, No. 1, 101-104 (2006).
- [WEN] U. Wenzel, Dissertation, TU Berlin, 2000.
- [WER] J. R. Wenner, M. C. Williams, I. Rouzina, V.A. Bloomfield, *Biophysical Journal* 82, 3160-3169 (2002).
- [WHI] A. Kumar, G. M. Whitesides, *Appl. Phys. Lett.* 63, 2002-2004 (1993).
- [WIL] M. C. Williams, J. R. Wenner, I. Rouzina, V. A. Bloomfield, *Biophysical Journal* 80, 874-881 (2001).

- 
- [WIS] A. Wissmann, R. Baumeister, G. Müller, B. Hecht, V. Helbl, K. Pfeleiderer, W. Hillen, *EMBO Journal* 10, 4145-4152 (1991).
- [YOK] H. Yokota, F. Johnson, H. Lu, R. M. Robinson, A. M. Belu, M. D. Garrison, B. D. Ratner, B. J. Trask, D. L. Miller, *Nucleic Acids Research* 25, No. 5, 1064-1070 (1997).
- [ZIM] R. M. Zimmermann, E. C. Cox, *Nucleic Acids Research* 22, No. 3, 492-497 (1994).
- [ZHU] V. B. Zhurkin, Y. P. Lysov, V. I. Ivanov, *Nucleic Acids Research* 6, No. 3, 1081-1096 (1979).

---

## Anhang

### A Experimentelle Methoden

#### A1 Herstellung der PDMS-Stempel

Verwendet wurde *Sylgard 184 Silicone Elastomer Kit*. PDMS und Vernetzer wurden in einem Masseverhältnis von 9:1 gemischt, anschließend 1 Stunde entgast und über Nacht bei 65 °C ausgehärtet.

Strukturierte Stempel wurden durch Abgießen entsprechender Master aus Silizium hergestellt.

#### A2 Reinigung von Deckgläsern

Deckgläser wurden gereinigt, indem sie nacheinander für je 10 min in rauchende Salpetersäure und 1 M Natronlauge eingelegt, danach mit destilliertem Wasser gespült und anschließend 2 Stunden lang bei 105 °C getrocknet wurden.

#### A3 Präparation von AFM-Proben (für Kapitel 4)

Glimmer wurde frisch gespalten. Ein 5 µl großer Tropfen der Lösung mit 20 ng DNA wurde auf die Glimmeroberfläche aufgesetzt und 4 Minuten lang in feuchter Umgebung stehen gelassen. Anschließend wurde die Probe mit destilliertem Wasser aus der Pipette vorsichtig gespült und im Stickstoffstrom trocken geblasen.

## B Eingesetzte Materialien und Geräte

### DNA

Standards	50 bp DNA Ladder	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
	Lambda <i>Hind</i> III	NEB (New England Biolabs) GmbH, Frankfurt/Main
	2-Log DNA Ladder (0,1-10,0 kbp)	NEB, Frankfurt/Main
Plasmide	pUC19/AV16	Universität Erlangen
	pWH 1014/2c	Universität Erlangen
$\lambda$ -DNA	$\lambda$ -DNA	NEB, Frankfurt/Main
	$\lambda$ - <i>tetO</i> -DNA	Universität Erlangen
Primer PCR	for: 5' – TTC CGA GTC ACG ACG TTG – 3'	MWG Biotech AG, Martinsried
	back: 5' – AAC GCA ATT ATT GTG AGT TAG C – 3'	

### Proteine, Antikörper, Enzyme

TetR-Proteine	TetR, Variante BD	Universität Erlangen
	scTetRtD <sub>L</sub> , Variante B	
	scTetRtD <sub>L</sub> , Variante BD	
Anti-TetR	Monoklonal Maus IgG1, TET03	MoBiTec GmbH, Göttingen
	Polyklonal, 3091	SEQLAB GmbH, Göttingen
Restriktionsendonukleasen (und zugehörige, mitgelieferte Puffer und evt. BSA)	<i>Bgl</i> III	NEB, Frankfurt/Main
	<i>Sma</i> I	
	<i>Sap</i> I	
	<i>Bpm</i> I	
	<i>Sca</i> I	
	<i>Ssp</i> I	

### Kommerzielle Kit-Systeme

PCR-Mastermix	Promega GmbH, Mannheim
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN GmbH, Hilden

## Elektrophorese

Reagenzien für PAA-Gel	Acrylamid-Bis-Lösung (37,5:1), 30%	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	
	Ammoniumpersulfat	MERCK KGaA, Darmstadt
Agarosen	Seakem LE Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
	Seakem Gold Agarose	
Ladepuffer	6x Blue/Orange Loading Dye	Promega GmbH, Mannheim
	Ficoll Typ 400	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Laufpuffer	TBE, TAE (siehe unten)	
Nukleinsäure Gel-stain	SYBR Green I	Molecular Probes, über Invitrogen GmbH Karlsruhe
Gelgießstand und -kammer für vertikale PAA-Gele	Mini-PROTEAN 3 Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Gelkammer für horizontale Gele	EASYCAST™ Horizontal Electrophoresis System	OWI Separation Systems, Portsmouth (USA)
Geldokumentationssystem		Biostep GmbH, Jahnsdorf

## Puffersubstanzen

1 x TBE	89 mM Tris Base	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
	89 mM Borsäure	FLUKA, über Sigma-Aldrich, Taufkirchen
	2 mM EDTA	FLUKA, über Sigma-Aldrich, Taufkirchen
1 x TAE	40 mM Tris Base	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
	40 mM Eisessig	VWR International GmbH, Darmstadt
	1 mM EDTA	FLUKA, über Sigma-Aldrich, Taufkirchen
NEBuffer 3	NEB, Frankfurt/Main	
NEBuffer 4		
HEPES	MERCK, KGaA, Darmstadt	
MES	FLUKA, über Sigma-Aldrich, Taufkirchen	
AMPSO	FLUKA, über Sigma-Aldrich, Taufkirchen	
Zitronensäuremonohydrat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	
Phosphatpuffer: Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat, Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	MERCK, KGaA, Darmstadt	

## Weitere Reagenzien

Vernetzer	Glutaraldehyd, 25%	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Fluoreszenzmarker DNA	YOYO-1-Iodid	Molecular Probes, über Invitrogen GmbH Karlsruhe
Salpetersäure, rauchend		Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natronlauge		Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Salzsäure		Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumchlorid		Sigma-Aldrich, Taufkirchen

## Weitere Materialien

Glimmer		Plano GmbH, Wetzlar
Deckgläser	24x24 mm, Stärken 0- 1,5, (entspricht 80-190 µm)	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
PDMS	Sylgard 184 Silicone Elastomer Kit	Dow Corning GmbH, Wiesbaden

## Geräte

Rasterkraftmikroskop	NanoScope III	Digital Instruments, über Veeco Instruments GmbH, Mannheim
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 200 M	ZEISS
PCR-Cycler	Mastercycler Personal	Eppendorf AG Hamburg
Tischzentrifuge	EBA 12	Andreas Hettich GmbH & Co KG, Tuttlingen
Biophotometer		Eppendorf AG Hamburg
pH-Messgerät	inolab 3	WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim
Kontaktwinkelmessgerät Surftens		OEG, Frankfurt/Oder
UV/VIS-Spektrophotometer	Cary 50 BIO	Varian Deutschland GmbH, Darmstadt
Mikromanipulator		Luigs & Neumann Feinmechanik + Elektrotechnik GmbH, Ratingen



## **Danke!**

Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützten und zu ihrem Gelingen beigetragen haben:

Herrn Professor Wolfgang Pompe danke ich sehr herzlich für das Ermöglichen dieser Arbeit an seiner Professur, für seine Unterstützung und Begeisterung, mit der er mich sehr motivierte. Danke für die Gespräche und Diskussionen, bei denen ich viel lernen durfte.

Herrn Dr. Michael Mertig gilt mein Dank für die Betreuung und sein Interesse am Fortschritt der Arbeit, für zahlreiche fachliche Ratschläge und ständige Diskussionsbereitschaft.

Bei der gesamten Arbeitsgruppe *BioNanotechnologie und Strukturbildung* möchte ich mich für die gute Arbeitsatmosphäre und stete Hilfsbereitschaft bedanken. Insbesondere danke ich Katrin Günther für ihre Freundschaft und ihr Interesse am Gelingen des Projektes sowie meinem „DNA-Kollegen“ Dr. Jörg Opitz für die vielen Diskussionen und die Durchsicht des Manuskriptes. Für die experimentelle Hilfe im Rahmen ihrer Belegarbeiten möchte ich mich bei Christiane Knieb und Karsten Rasim ganz herzlich bedanken.

Der Arbeitsgruppe *Tet-Repressor* von Herrn Professor Wolfgang Hillen am Institut für Mikrobiologie der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg möchte ich sehr für die gute Zusammenarbeit danken. Ganz besonders bin ich Dr. Oliver Scholz zu Dank verpflichtet, der mir einen Arbeitsaufenthalt in seinem Labor ermöglichte und ständig für Fragen und Diskussionen zur Verfügung stand. Marius Majewski danke ich für die Konstruktion und Überlassung der verschiedenen Tet-Repressor-Proteine und Steffi Wisshak für die äußerst aufwändige Vervielfältigung und Aufreinigung der Phagen-DNA  $\lambda$ -*tetO*.

Meiner Familie, ganz besonders Luise Benke, danke ich für die Unterstützung in dieser besonderen Zeit.

Finanzielle Unterstützung gewährten die DFG durch Förderung der Forschergruppe „Nanostrukturierte Funktionselemente in makroskopischen Systemen“ (FOR 335) und das BMBF durch Förderung des Projektes „Selbstorganisation von Kohlenstoffnanoröhren für die Nano- und Mikroelektronik“ (FKZ 13N8512).